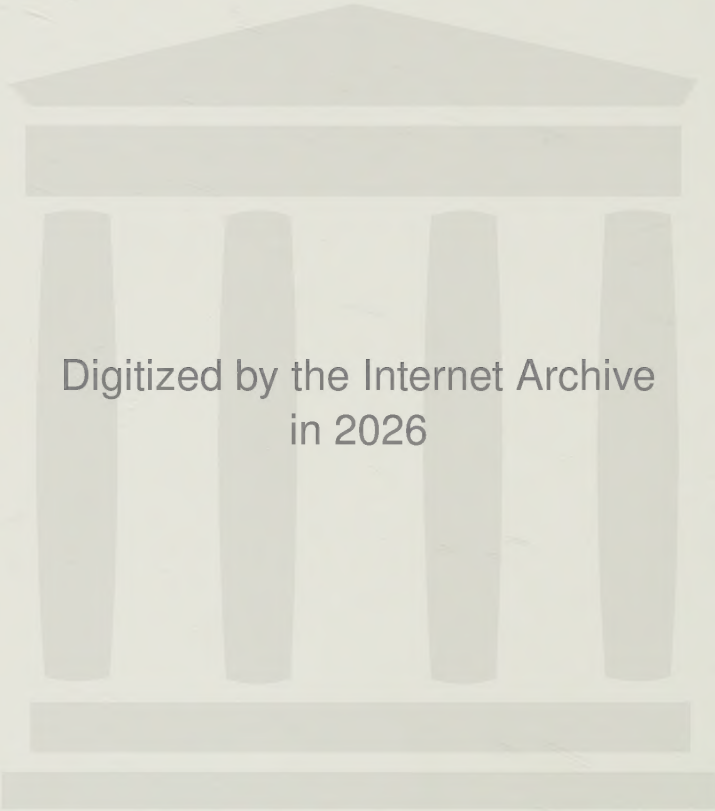


**Der Citrat - Metabolismus
von *Klebsiella pneumoniae*:
Molekularbiologische Charakterisierung
der beteiligten Gene**

Elisabeth Schwarz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0031

Der Citrat - Metabolismus von *Klebsiella pneumoniae* :
Molekularbiologische Charakterisierung der beteiligten Gene

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elisabeth Schwarz

München, 1986

1. Berichterstatter: Prof.Dr.D.Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof.Dr.E.-L.Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.1986

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

A. ZUSAMMENFASSUNG	1
B. EINLEITUNG	5
1. Die Natrium-Pumpe Oxalacetat-Decarboxylase	5
2. Die Oxalacetat-Decarboxylase als Schlüssel- enzym für anaeroben Citratabbau bei Enterobakterien	8
C. MATERIAL UND METHODEN	12
1. Materialien	12
1.1. Chemikalien	12
1.2. Enzyme	14
1.3. Marker-Proteingemisch	14
1.4. Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen	15
1.4.1. Bakterienstämme	15
1.4.2. Plasmide und Bakteriophagen	16
2. Methoden	17
2.1. Nährmedien	17
2.1.1. Vollmedien	17
2.1.2. Minimalmedium	18
2.1.3. Nährmedien mit Zusätzen	19

2.2. Wachstum von Bakterien	19
2.2.1. Bakterienanzucht	19
2.2.2. Aufnahme von Wachstumskinetiken	20
2.3. Biochemische Methoden	20
2.3.1. Aufarbeitung der Zellen für Rohextrakte und Vesikelpräparationen	20
2.3.2. Enzymtests für Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase	21
2.3.3. Transfer von Protein auf Nitrocellulose und Immun-Fluoreszenz-anfärbung	22
2.4. Genetische Methoden	23
2.4.1. Konjugation	23
2.4.2. Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA	23
2.4.3. Transfektion mit rekombinanter M13 Phagen DNA	24
2.4.4. <i>In vitro</i> Verpackung von λ oder Cosmid DNA	24
2.4.5. Infektion von <i>E.coli</i> C600 mit <i>in vitro</i> verpackter λ DNA - Test der Verpackungseffizienz	25
2.4.6. Infektion von <i>E.coli</i> DH1 mit <i>in vitro</i> verpackter Cosmid-DNA	25
2.5. MNNG-Mutagenese von <i>K.pneumoniae</i>	26
2.5.1. Bestimmung der Überlebensraten bei verschiedenen MNNG-Konzentrationen	26
2.5.2. Mutagenese	26
2.5.3. Bromdesoxyuridinanreicherung zur Isolierung von anaeroben Cit ⁻ Mutanten	27
2.6. Präparation der <i>in vitro</i> Verpackungsgemische	27

2.7. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen im Umgang mit DNA und RNA	29
2.8. Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA	31
2.8.1. Fällern von DNA	31
2.8.2. RNase-Behandlung von DNA-Proben	31
2.8.3. Phenolextraktion	31
2.8.4. Restriktionsanalyse von DNA-Proben durch Agarose-Gelelektrophorese	32
2.8.5. Elektroelution von DNA-Banden	32
2.9. Allgemeine Klonierungstechniken	33
2.9.1. Phosphatase-Behandlung von Vektor-DNA	33
2.9.2. Ligierung mit T4-Ligase	33
2.10. Präparation von DNA	33
2.10.1. Präparation von chromosomaler DNA aus <i>K.pneumoniae</i> und <i>E.coli</i> Zellen	33
2.10.2. Präparative Plasmidisolierung	35
2.10.3. "Minipräparationen" von Plasmid-DNA	36
2.10.4. Isolierung von λ DNA	36
2.10.5. Präparative Isolierung der RF-Form von M13 Derivaten	37
2.10.6. Einzelstrangisolierung der M13 Derivate	37
2.11. Präparation von Gesamt-RNA aus Subklon DH1/Sc1	38
2.12. Übertragung von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose-Filter bzw. GeneScreen Membranen	39
2.12.1. Übertragung von DNA auf Nitrocellulose	39

2.12.2. Übertragung von RNA aus Formaldehyd- gelen auf GeneScreen Membranen	40
2.13. Hybridisierung filtergebundener DNA	41
2.13.1. Hybridisierung mit ^{32}P -mar- kierten Plasmiden	41
2.13.2. Hybridisierung mit ^{32}P -mar- kierten Oligonukleotiden	41
2.14. Hybridisierung filtergebundener RNA	42
2.15. Radioaktive Markierung von Nuklein- säuren	43
2.15.1. Markierung von Plasmiden durch Nick-Translation	43
2.15.2. Markierung von synthetischen Oligonukleotiden durch Polynukleotid- kinase (PNK) - Behandlung	44
2.16. Synthetische Oligonukleotide	44
2.17. DNA Sequenzierung	45
2.18. Gewinnung von Antikörpern aus Kanin- chen	46
2.18.1. Immunisierung	46
2.18.2. Serumgewinnung	46
2.19. Immuno-Test von <i>E. coli</i> Transfor- manten	46
D. ERGEBNISSE	48
1. Versuche zur Isolierung der Gene der Oxalacetat-Decarboxylase durch Mutagenese	48

1.1. Versuch zur Klonierung durch Komplementation Mutagenese-induzierter Defekte	48
1.1.1. Isolierung von anaeroben Cit ⁻ Mutanten nach chemischer Mutagenese	48
1.1.2. Versuche zur Komplementation einer Cit ⁻ Mutante mit Wildtyp-DNA	54
1.2. Versuche zur Markierung der Gene durch Transposon Tn5 Mutagenese	58
1.2.1. Insert-Inaktivierung der Citrat-Fermentationsgene durch Tn5 Mutagenese	58
1.2.2. Klonierung des Tn5 enthaltenden DNA Fragmentes aus Mutante T03-1	61
2. Klonierung der Oxalacetat-Decarboxylase Gene durch Expression in <i>E.coli</i> Cosmid-Klonen	62
2.1. Isolierung von drei Citrat verwertenden <i>E.coli</i> Klonen aus einer Cosmid-Genbank mit <i>K.pneumoniae</i> DNA	62
2.2. Untersuchung der drei Cit ⁺ <i>E.coli</i> Klone	63
2.2.1. Vergleich der Restriktionsmuster der isolierten Cosmide	63
2.2.2. Wachstumseigenschaften der drei Cit ⁺ <i>E.coli</i> Klone in Citratmedium	65
2.2.3. Nachweis des Cosmid-kodierten Cit ⁺ Phänotyps durch Transformationsexperimente	68
2.2.4. Instabilität von Cosmid pES3	69

2.3. Nachweis der durch Plasmid pES3 vermittelten Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität	74
2.4. Immunologischer Nachweis der durch pES3 vermittelten Citrat-Lyase	77
3. Genetische Untersuchung der Citrat-Fermentationsgene	79
3.1. Subklonierung des Gens für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase	79
3.2. Grobkartierung des Plasmids pES3 und Vorschlag zur Anordnung der Gene für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase und die γ Untereinheit der Citrat-Lyase	83
3.3. DNA Sequenz des Aminoterminus der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase	87
3.4. Versuch zum Nachweis einer polycistronischen m-RNA in Transformanten mit Plasmid pSC1	90
E. DISKUSSION	93
1. Transposon Tn5- und chemische Mutanten	93
2. Isolierung von drei Citrat verwertenden <i>E. coli</i> Klonen aus einer Cosmid-Genbank	96
3. Isolierung der Citrat-Fermentationsgene	

durch Plasmid pES3

100

F. LITERATUR

104

G. ABKURZUNGEN

114

A. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Gene der Na^+ -Pumpe Oxalacetat-Decarboxylase aus *K.pneumoniae* zu isolieren und damit die Voraussetzung für eine Aufklärung der Primärstruktur durch DNA Sequenzierung zu schaffen. Weiterhin sollte die Expression der Oxalacetat-Decarboxylase Gene in *E.coli* untersucht werden.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Nach chemischer Mutagenese (MNNG) von *K.pneumoniae* ATCC 13882 wurden sechs Mutanten isoliert, die nicht mehr in der Lage waren, Citrat anaerob abzubauen (anaerober Cit-Phänotyp). Fünf der Mutanten zeigten sowohl eine stark reduzierte Oxalacetat-Decarboxylase wie eine verminderte Citrat-Lyase Aktivität. Durch Immun-Fluoreszenzanfärbung konnte bei diesen Mutanten eine fehlende Synthese von Untereinheiten der beiden Enzyme nachgewiesen werden. Nur eine Mutante besaß eine dem Wildtyp vergleichbare Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität, dagegen eine verminderte Citrat-Lyase Aktivität. Versuche, eine der Mutanten *in trans* zum ursprünglichen anaeroben Cit⁺ Phänotyp zu komplementieren, blieben ohne Erfolg. Weitere Komplementationsexperimente mit den Mutanten wurden abgebrochen, nachdem eine hohe Rekombinationsrate in *K.pneumoniae* ATCC 13882 beobachtet worden war.

2. Um die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase durch das Transposon Tn5 zu markieren und hiermit homologe DNA Proben für die Isolierung der Wildtyp-Gene zu erhalten, wurde Tn5 Mutagenese durchgeführt. Es wurden fünf weitere Mutanten erhalten, die ebenfalls eine reduzierte Aktivität beider Enzyme, also der Oxalacetat-Decarboxylase und der Citrat-Lyase, aufwiesen. Bei der stabilsten Tn5-Mutante (T03-1) konnte mittels Immun-Fluoreszenzanfärbung

nachgewiesen werden, daß weder die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase noch die α und β Untereinheiten der Citrat-Lyase synthetisiert wurden. Der das Transposon enthaltende DNA-Bereich, ein 15 kb *Eco* RI Fragment, konnte in pBR322 kloniert werden. Allerdings wurde das Plasmid nicht näher untersucht, da in Parallelversuchen die Citrat-Fermentationsgene isoliert worden waren.

3. Drei Cosmid-Transformanten des *E. coli* Stammes DH1 mit *K. pneumoniae* Wildtyp-DNA waren in der Lage, Citrat abzubauen. Zwei Isolate zeigten nur aerobe Citratverwertung, ein Klon (DH1/Cit3) dagegen wuchs auch im Anaeroben mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle. Die Generationszeiten der drei Cit⁺ Klone in Citrat-Minimalmedium wurden bestimmt. Aus Transformationsversuchen mit den isolierten Cosmiden ergab sich, daß der Cit⁺ Phanotyp in allen drei Fällen vom Plasmid vermittelt wird. Wie aus Restriktionsabbau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hervorging, liegen in keinem der Plasmid-Inserts identische Restriktionsfragmente vor.

4. Durch Enzymtests und Immun-Fluoreszenzanfärbung konnte in Klon DH1/Cit3 die Synthese einer aktiven Oxalacetat-Decarboxylase nachgewiesen werden. Neben den Genen dieses Enzyms enthält Plasmid pES3 aus DH1/Cit3 offensichtlich auch die Gene der Citrat-Lyase, da Proteinextrakte der Zellen eindeutig mit Antiserum gegen die Citrat-Lyase reagierten. Weiterhin gibt es mehrere Hinweise, daß das Plasmid auch ein Citrat-Transportsystem und die Regulation der Citrat-Fermentationsgene vermittelt.

5. Plasmid pES3 zeigte eine große Instabilität, die auf die Existenz von zwei Vektormolekulan im Plasmid zurückgeführt wurde. Ein Zerfall des Plasmids und damit der Verlust der Cit⁺ Phanotyp bewirkenden Gene konnte durch ständige Kultivierung der Zellen in Citrat-Minimalmedium verhindert werden.

6. Eine Eingrenzung des Gens der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase erfolgte über Subklonierung in das Expressionsvektorsystem pIN-III-A. Im Vergleich zu drei weiteren Expressionsklonen synthetisierte Klon JA221/Sc1 (mit Plasmid pSC1) die große Untereinheit am besten. Aus Plasmid pSC1 konnte ohne Auswirkung auf die Expression der Untereinheit das promotorproximale 2.5 kb *Eco* RI Fragment entfernt werden. Von dem daraus sich ergebenden Plasmid pSC1E wurde eine Restriktionskarte erstellt. Aus Hybridisierungsversuchen mit synthetischen Oligonukleotiden ging hervor, daß der Aminoterminus der Untereinheit unmittelbar stromabwärts vom Vektorpromotor, auf einem *Pst* I-*Xba* I Fragment lag. Nach Umklonierung in M13 Vektoren wurde durch DNA Sequenzierung die Reihenfolge der 78 aminoterminalen Aminosäuren bestimmt.

7. Eine durch Plasmid pSC1 kodierte polycistronische m-RNA, die nach Überlesen des deletierbaren 2.5 kb *Eco* RI Fragmentes und des Strukturgens der großen Untereinheit eine Größe von etwa 4500 Nukleotiden besitzen sollte, konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings ergab ein sehr viel kleineres Transkript von etwa 800 Nukleotiden ein positives Signal mit einem Restriktionsfragment, das den Carboxylterminus der großen Untereinheit kodiert. Da die Insert-DNA von Plasmid pSC1E (pSC1) zwei auf dem Cosmid pES3 getrennt liegende Restriktionsfragmente enthält, blieb unklar, ob der offene Leserahmen für dieses Transkript ursprünglich in Plasmid pES3 stromabwärts in Nachbarschaft des Gens für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase lag.

8. Von Plasmid pES3 wurde eine Restriktionskarte erstellt. Die Anordnung der Gene für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase und der γ Untereinheit der Citrat-Lyase konnte mit synthetischen Oligonukleotiden ermittelt werden. Nicht geklärt werden konnte, warum zwei DNA Fragmente mit dem Oligonukleotidgemisch, das für ein Peptid der γ Untereinheit der Citrat-Lyase kodiert,

hybridisierten. Die Leserichtung des Gens für die große Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase ergab sich aus den DNA Sequenzdaten und den Ergebnissen der Restriktionskartierung von Plasmid pES3 und pSC1E.

B. EINLEITUNG

Gegenstand dieser Arbeit war die Isolierung der Gene der Oxalacetat-Decarboxylase aus *Klebsiella pneumoniae* und die Untersuchung der Expression und Funktion dieses Membranproteins in *Escherichia coli* Zellen, einem heterologen, aber nah verwandten System.

Eine derartige Analyse der Oxalacetat-Decarboxylase ist aus zwei Gründen von wissenschaftlichem Interesse:

1. Die Na^+ -abhängige Oxalacetat-Decarboxylase verwandelt die bei der Decarboxylierungsreaktion freiwerdende Energie in die eines Natrium-Gradienten. Somit stellen Enzyme dieser Art einen neuen Mechanismus der Energiekonservierung dar.

2. Zusammen mit der Citrat-Lyase ermöglicht die Oxalacetat-Decarboxylase bei *Klebsiella pneumoniae* anaeroben Citratabbau. Eine Klonierung und Expression dieses Enzyms in *E. coli* Zellen, die keine Oxalacetat-Decarboxylase aufweisen, kann Beiträge zur Aufklärung des anaeroben Citrat-Metabolismus in Enterobakterien liefern.

1. Die Natrium-Pumpe Oxalacetat-Decarboxylase.

Eine unabdingbare Voraussetzung für das Funktionieren jeder lebenden Zelle ist das Vorhandensein eines Membranpotentials. Als Beispiele hierfür werden häufig das Aktionspotential von Nervenzellen oder das Membranpotential bei den Zellorganellen der Eukaryonten, den Mitochondrien, angeführt.

Eine Aufladung der Membran von Bakterienzellen findet durch ATP- oder Licht-getriebene Ionenpumpen sowie durch Elektronentransportketten bei aerober und anaerober Atmung

statt. Seit wenigen Jahren jedoch ist eine weitere "Energiequelle" für Ionenverschiebungen über die Bakterienmembran bekannt, die auf freien Enthalpieänderungen bei der Decarboxylierungsreaktion eines Substrats beruht. In diesem Fall handelt es sich um membrangebundene, biotinenthaltende Decarboxylasen, die Natrium-Ionen aus der Zelle pumpen und bei verschiedenen fakultativ oder obligat anaeroben Bakterienarten vorkommen.

Die Oxalacetat-Decarboxylase bei *Klebsiella pneumoniae* (früher *Aerobacter aerogenes*) wurde erstmals von Stern (1967) beschrieben. Das Enzym wurde in Arbeiten von P.Dimroth biochemisch untersucht und charakterisiert (Dimroth, 1980; Dimroth, 1981; Dimroth, 1982). Die Na⁺-abhängige Decarboxylase besteht aus drei Untereinheiten mit den Molekulargewichten $\alpha=65\text{kD}$, $\beta=34\text{kD}$ und $\gamma=12\text{kD}$, (Dimroth & Thomer, 1983). Auf Grund biochemischer Daten wurde postuliert, daß hier ähnlich wie bei den H⁺-ATPasen ein hydrophiler Kopf (α Untereinheit) ins Cytoplasma hineinreicht und die beiden anderen Untereinheiten (β und γ) das Enzym in der Membran verankern (Dimroth & Thomer, 1983). Eine diesem Enzym sehr ähnliche Oxalacetat-Decarboxylase wurde auch bei *Salmonella typhimurium* entdeckt (P.Dimroth, unveröffentlichte Daten).

Neben der Oxalacetat-Decarboxylase bei diesen beiden Enterobakterienarten sind Coenzym A gebundene Dicarboxylsaurer wie Methylmalonyl-CoA und Glutaconyl-CoA als weitere Substrate für Na⁺-abhängige Ionenpumpen bei einigen wenigen Bakterienarten bekannt, die nicht zur Familie der Enterobakterien gehören und phylogenetisch weit voneinander entfernt stehen.

Die bei *Acidaminococcus fermentans*, *Peptococcus aerogenes* und *Clostridium symbiosum* vorkommenden Glutaconyl-CoA Decarboxylasen wurden von W.Buckel untersucht (Buckel & Semmler, 1982). Auf Grund dieser Ergebnisse und der Arbeiten

von P.Dimroth kann eine nahe Verwandtschaft der Proteine ausgeschlossen werden; so ist in *P.aerogenes* die biotinenthaltende Untereinheit als kleines Polypeptid von 15-20kD bestimmt worden, während die prosthetische Gruppe bei *K.pneumoniae* auf einem Polypeptid von 65kD und bei *A. fermentans* auf einer sehr großen Untereinheit von 120-140kD liegt (Buckel & Semmler, 1983).

Als dritte Gruppe der bekannten Na^+ -abhängigen Decarboxylasen sind Methylmalonyl-CoA Decarboxylasen bei *Veillonella alcalescens* (früher *Micrococcus lactilyticus*) und *Propionigenium modestum* zu nennen (Galivan & Allen, 1968; Hilpert & Dimroth, 1982; Hilpert et al. 1984). Das anaerob lebende Bakterium *P.modestum* ist in der Lage, von der geringen Änderung der freien Enthalpie, die beim Abbau von Succinat zu Propionat entsteht ($\Delta G = -20.6 \text{ kJ/mol}$), den gesamten Energiestoffwechsel zu bestreiten. W.Hilpert et al. haben gezeigt, wie hier allein auf der Basis des Natrium Gradienten die Energiekonservierung stattfindet (Hilpert et al. 1984). Damit ist nachgewiesen, daß Na^+ -abhängige Decarboxylasen zur Energetisierung der Membran nicht nur beitragen, sondern unter gegebenen Bedingungen die alleinige Grundlage für eine Energiekonservierung über Jonengradienten darstellen können.

Eine Aufklärung des Mechanismus der Energieübertragung, der Lokalisierung des Jonenkanals und daran beteiligter essentieller Gruppen ist Ziel von Struktur-Funktions Untersuchungen. Da neben den von W.Buckel bearbeiteten Glutaconyl-CoA Decarboxylasen die von P.Dimroth beschriebene Oxalacetat-Decarboxylase bei *K.pneumoniae* biochemisch am besten charakterisiert worden und zudem *Klebsiella* genetisch relativ gut zugänglich ist, sollten die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase isoliert werden, um über DNA Sequenzierung die Primärstruktur der drei Untereinheiten des Enzyms aufzuklären und damit die Voraussetzung für eine spätere Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen zu

schaffen.

2. Die Oxalacetat-Decarboxylase als Schlüsselenzym für anaeroben Citratabbau bei Enterobakterien

Einen wesentlichen Bestandteil der diagnostisch angewandten, mikrobiologischen Bestimmung von Enterobakteri-
enarten, des sogenannten "IMViC" Tests, stellt die Untersuchung der Citratverwertung dar. Die stark divergierenden stoffwechselphysiologischen Unterschiede im Hinblick auf aeroben und anaeroben Citratabbau bei *E.coli* und *K.pneumoniae* sollen im folgenden Abschnitt besprochen werden.

Wildtyp *E.coli* Zellen sind nicht in der Lage, auf Citrat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Offensichtlich fehlt bei *E.coli* ein Transportsystem (Lara & Stokes, 1952) für dieses Molekül, da internes Citrat als Intermediat des Tricarbonsaurezyklus in Gegenwart eines externen Elektronenakzeptors veratmet werden konnte. Wiederholt sind in der Literatur jedoch atypische *E.coli* Isolate beschrieben worden, die Citrat aerob abbauen (Shinagawa et al. 1982; Reynolds & Silver, 1983; Tomas & Kay, 1984). Bis auf eine Ausnahme ist die Grundlage für diesen Cit⁺ Phanotyp plasmidkodiert. Viele der Cit⁺ Determinanten liegen auf konjugativen Plasmiden oder deren Transposons (Ishiguro & Sato, 1979; Shinagawa et al. 1982; Ishiguro et al. 1982). Eine ausführliche genetische Analyse eines derartigen Cit⁺ Transposons (Tn3411) ist in Arbeiten von Ishiguro und Sato (Ishiguro & Sato, 1984) durchgeführt worden. Das Genprodukt eines weiteren Cit⁺ Phanotyp bewirkenden DNA Fragments wurde als Membran-assoziiertes Polypeptid identifiziert (Hirato et al. 1984). Durch DNA Sequenzierung der Cit⁺ Determinanten des Transposons Tn3411 und eines natürlichen Plasmidisolates wurde in Arbeiten von Ishiguro und Sato (1985) und Sasatsu et al. (1985) die Primärstruktur der Citrat-Transportproteine

aufgeklärt. Des weiteren konnten Tomas und Kay (1984) zeigen, daß bei einem Cit⁺Isolat aus der Tierzucht ein Protein der äußeren Membran am Citrat-Transport beteiligt ist. Es wird allerdings diskutiert, daß dieses Membranprotein von einem in Wildtyp *E.coli* Zellen kryptischen Gen kodiert wird. Dieses Gen wird - wie die Autoren vermuten - durch einen Genabschnitt aktiviert, der in dem isolierten Isolat nun auf einem episomalen F-Faktor liegt. Kryptische Gene für Citrat-Transport in *E.coli* wurden auch von Hall postuliert, der durch komplexe Selektionsschritte eine Doppelmutante von *E.coli* K12 erhielt, die Cit⁺ Phänotyp aufwies (Hall, 1982).

Während all diese Arbeiten die aerobe Citratverwertung von *E.coli* behandeln, wurde in einer Veröffentlichung von Lütgens und Gottschalk (1980) die Citratfermentation untersucht; Citrat kann als Kohlenstoffquelle im Anaeroben genutzt werden, wenn den Zellen ein Cosubstrat angeboten wird, das Reduktionsäquivalente für die Bildung von Succinat aus Oxalacetat bereitstellt. Der von Lütgens und Gottschalk postulierte anaerobe Citratabbau besteht in der Umkehr des Tricarbonsäurezyklus von Citrat zu Succinat und ist in Abb.1 gezeigt. Da Citrat allerdings zuerst in die Zelle gelangen muß, wird die Existenz eines anaeroben Citrat-Transportsystems gefordert, für das es jedoch sonst keine weiteren experimentellen Hinweise gibt. Setzt man diese Hypothese als richtig voraus, kann argumentiert werden, daß *E.coli* nur durch das Fehlen der Oxalacetat-Decarboxylase nicht in der Lage ist, Citrat wie *K.pneumoniae* zu fermentieren.

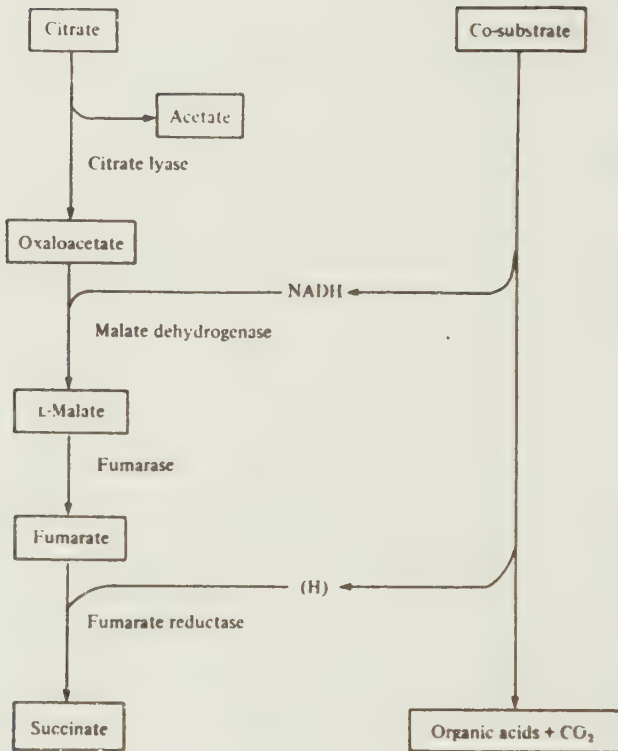
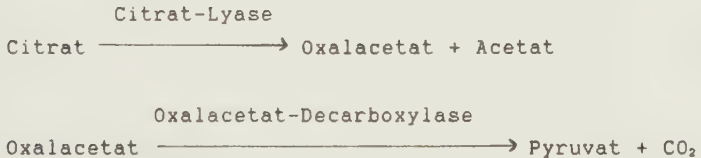


Abb.1: Cosubstrat abhängige Citratfermentation bei *E. coli*,
übernommen von Lütgens und Gottschalk (1980).

Bei *K.pneumoniae* werden die Enzyme Citrat-Lyase und Oxalacetat-Decarboxylase durch Citrat im Medium induziert. Der fermentative Metabolismus laßt sich mit zwei Reaktionen beschreiben:



Das gebildete Pyruvat geht in die Abbauewege der gemischten Säuregarung ein.

Im Aeroben wird Citrat bei *K.pneumoniae* offensichtlich über den Tricarbonsäurezyklus veratmet und es wird angenommen, daß *K.pneumoniae* sowohl ein aerobes als auch ein anaerobes Citrat-Transportsystem besitzt (P.Dimroth, persönliche Mitteilung).

Eine Klonierung der Oxalacetat-Decarboxylase aus *K.pneumoniae* in *E.coli* kann Aufschluß über Expression und Funktion dieses fremden Membranproteins in einem heterologen Wirt geben. Wenn zusätzlich das von Lutgens und Gottschalk postulierte anaerobe Citrat-Transportsystem vorliegt, sollte darüberhinaus eine funktionelle Oxalacetat-Decarboxylase in *E.coli* Membranen einen anaeroben Cit⁺Phanotyp bewirken, also Citrat-Fermentation erlauben. Derartige Untersuchungen werden demnach zur Klärung des anaeroben Citrat-Metabolismus bei Enterobakterien beitragen.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Chemikalien

Acrylamid	Biorad, Munchen, FRG
Agarose ME	Serva, Heidelberg, FRG
Albumin aus Rinderserum	Seakem, Marine Colloids Div. FMC Corp., Rockland, ME, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Munchen, FRG
Ampicillin	Biorad, Munchen, FRG
Antifoam A	Sigma, Munchen, FRG
Bacto-Agar	Sigma, Munchen, FRG
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, Michigan, USA
Bindsilan	Difco, Detroit, Michigan, USA
Borsaure	LKB, Grafelfing, FRG
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, Munchen, FRG
5-Brom-2-desoxy-uridin	Boehringer, Mannheim, FRG
Casiumchlorid	Boehringer, Mannheim, FRG
Chloramphenicol	Baker, Grossgerau, FRG
DE 81 Papier	Boehringer, Mannheim, FRG
DNA-Langenstandards	Whatman Ltd., Maidstone, UK
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim, FRG
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Boehringer, Mannheim, FRG
FITC-konjugierte Ziegen- anti-Hase-Antikorper	Sigma, Munchen, FRG
Freund'sches Adjuvans	Sigma, Munchen, FRG
	Behring Werke, Marburg, FRG

Gas Pak System	Becton & Dickinson, via Bender & Hobein, München, FRG
GeneScreen Nylonmembran	New England Nuclear, Dreieich, FRG
Guanidiniumrhodanit	Fluka, Neu-Ulm, FRG
Harnstoff	Sigma, München, FRG
Hefeextrakt	Difco, Detroit, Michigan, USA
8-Hydroxychinolin-	Serva, Heidelberg, FRG
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	
Kalbsthymus-DNA	Sigma, München, FRG
Kanamycin	Sigma, München, FRG
1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin (MNNG)	Serva, Heidelberg, FRG
3MM Chromatographiepapier	Whatman Ltd., Maidstone, UK
Nitrocellulose 0,45um	Schleicher und Schüll, Dassel, FRG
N,N-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg, FRG
Nukleotidtriphosphate	Biorad, München, FRG
NZ-Amine	Boehringer, Mannheim, FRG
Putrescin	Aldag, Hamburg, FRG
Polyethylenglycol(PEG)6000	Sigma, München, FRG
Repelsilan	Roth, Karlsruhe, FRG
SDS	LKB, Grafelfing, FRG
Sephadex G 50	Serva, Heidelberg, FRG
Spermidin	Pharmacia, Freiburg, FRG
Tetracyclin	Sigma, München, FRG
Streptomycin	Sigma, München, FRG
TEMED	Sigma, München, FRG
Trizma	Biorad, München, FRG
Trypton	Sigma, München, FRG
Uridin	Difco, Detroit, Michigan, USA
Xylencyanol	Boehringer, Mannheim, FRG
	Sigma, München, FRG

Alle weiteren Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von der Fa. Merck in Darmstadt,

Radiochemikalien wurden entweder von Amersham-Buchler in Braunschweig oder von New England Nuclear in Dreieich bezogen.

1.2. Enzyme

Citrat-Lyase	Boehringer, Mannheim, FRG
DNA-Polymerase I (<i>E.coli</i>) für Nick-Translation	Boehringer, Mannheim, FRG
DNA-Polymerase I Klenow-Fragment (<i>E.coli</i>)	BRL, Neu Isenburg, FRG
T4 DNA-Ligase (T4-infizierter <i>E.coli</i>)	Boehringer, Mannheim, FRG und von W.Oertel
Bakterielle alkalische Phosphatase (BAP)	Worthington, Freehold und Boehringer, Mannheim, FRG
T4-Polynukleotidkinase (T4-infizierter <i>E.coli</i>)	New England Biolabs, Schwalbach, FRG
Lactat Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim, FRG
Lysozym	Boehringer, Mannheim, FRG
Malat Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim, FRG
Pronase	Boehringer, Mannheim, FRG
Proteinase K	Boehringer, Mannheim, FRG
Ribonuklease A	Boehringer, Mannheim, FRG
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim, FRG BRL, Neu Isenburg PL Biochemicals, St. Goar New England Biolabs, Schwalbach, alle FRG

1.3. Marker-Proteingemisch

Eichproteine (BSA, 66kD; Ovalbumin, 45kD; Trypsinogen, 24kD; β -Lactoglobulin, 18.4kD; Lysozym, 14.3kD; Cytochrom, 12.5kD) wurden von Sigma, Munchen bezogen.

1.4. Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen

1.4.1. Bakterienstämme

Escherichia coli Stämme

Name	Genotyp	Herkunft/ Referenz
C600	<i>F⁻, thr1, leuB6, lacY1, supE44, thi-1, hsdR⁻, hsdM⁻, tonA21,</i>	W.Piepersberg
K802NR	<i>F⁻, hsdR⁻, met⁻, gal⁻, thi⁻, Rf^r, Nx^r,</i>	W.Piepersberg J.Davies
DH1	<i>F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r⁻, m⁺,) supE44, relA1? λ⁻,</i>	Hanahan, 1983
JA221	<i>hsdR⁻, trpE5, leuB6, lacY, recA, thi, F' (lacI⁺, lacZ⁺, lacY⁺, lacA⁺, proA⁺, proB⁺),</i>	M.Inouye
JM105	<i>thi, rpsL, endA, sbcB15, hsdR4, Δ(proAB-lac), F' (traD36, proAB, lacI⁺, lacZ, ΔM15),</i>	Yanish- Perron et al. 1985
BHB2688	<i>N205, recA⁻, (λimm434, cIts, b2, red3, Eam4, Sam7)/λ</i>	Hohn, 1979
BHB2690	<i>N205, recA⁻, (λimm434, cIts b2, red3, Dam15 Sam7)/λ</i>	" "

Die Genbezeichnung entspricht der von Bachmann (1983).

Klebsiella pneumoniae Stamm

Name	Genotyp	Herkunft/Referenz
ATCC 13882	Wildtyp	P.Dimroth

Rhizobium meliloti Stamm

Name	Genotyp	Herkunft/Referenz
53B1	Rm2011 Sm ^r , Rf ^r , (p220-12::Tn5Mob) RP4-4	A.Puhler

1.4.2. Plasmide und Bakteriophagen

Bezeichnung	Herkunft/Referenz
pBR322	Bolivar et al. 1977
pSUP205	Simon et al. 1983
pIN-III A1-3	Inouye, 1983
M13 mp18/19	Yanisch-Perron et al. 1985
λL1trp:	A.Puhler
Derivat v. NM607	Murray et al. 1977

2. Methoden

2.1. Nahrmedien

2.1.1. Vollmedien

LB (Luria Bertani) Medium (Miller, 1972)

pro Liter: 10g Bactotrypton

5g Hefeextrakt

10g NaCl

NZ Medium (modifiziert nach Maniatis et al. 1982)

pro Liter: 20g NZ Amine

5g NaCl

2g Glucose

1g Casamino Acids

2g MgSO₄

pH 7.5 wurde mit NaOH eingestellt.

LB Medium mit Maltose und Magnesium (LB MgMal)

pro Liter LB Medium: 4g Maltose

1g MgCl₂

TY Medium für Rhizobien (Beringer, 1974)

pro Liter 5.0g Bactotrypton

3.0g Hefeextrakt

1.3g CaCl₂

Zur Herstellung fester Nährboden wurde den Nährlösungen 1.5% Bacto Agar zugesetzt. Weichagar für λ Infektionsversuche bestand aus LB MgMal Medium mit 0.7% Agar, Weichagar für M13 Transfektion setzte sich aus 1% Trypton, 0.5% NaCl, 1mM MgSO₄, 0.65% Agar zusammen.

2.1.2. Minimalmedium

M9 Minimalmedium (Miller, 1972)

pro Liter: 100.0ml 10xM9 Salzlosung

1.0ml 1M MgSO_4

0.1ml 1M CaCl_2

2.0ml Vit.B1 (2mg/ml)

10xM9 Salzlosung

pro Liter: 60g Na_2HPO_4

30g KH_2PO_4

5g NaCl

10g NH_4Cl

Wenn im Text nicht anders angegeben, wurden unter a) aufgeführte Kohlenstoffquellen zu 20mM, unter b) aufgeführte Kohlenstoffquellen zu 40mM supplementiert.

a) Glucose (Glucose-Minimalmedium), Na-Citrat (Citrat-Minimalmedium), Mannitol, Maltose

b) Na-Pyruvat, Glycerin (Glycerin-Minimalmedium)

Zur Anzucht von auxotrophen Stämmen wurden Aminosäuren in einer Endkonzentration von $40\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Zur Herstellung von M9 Minimalmedium Agar Platten wurde Agar getrennt autoklaviert. Die Konzentration betrug wie oben 1.5%. Alle getrennt sterilisierten Supplemente wurden der 1xM9 Salzlösung nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.1.3. Nährmedien mit Zusätzen:

Nährmedien mit Antibiotikazusätzen:

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden Antibiotika dem nach dem Autoklavieren auf 60°C abgekuhlten Medium in den folgenden Konzentrationen zugegeben.

Ampicillin	100mg/l (Ap ¹⁰⁰)
Kanamycin	20mg/l (Km ²⁰)
Tetracyclin	25mg/l (Tc ²⁵)
Streptomycin	20mg/l (Sm ²⁰)
Chloramphenicol	20mg/l (Cm ²⁰)

Nährmedien mit IPTG-Zusätzen:

Für die Induktion der β -Galaktosidase der M13 Phagen wurde dem LB Medium nach Autoklavieren 50mg/l IPTG (LB-IPTG Medium) zugesetzt. Zur Aktivierung des Expressionspromotors im Vektor pIN-III-A wurden den jeweiligen Medien IPTG bis zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben.

2.2. Wachstum von Bakterien

2.2.1. Bakterienanzucht

E.coli und *K.pneumoniae* Kulturen wurden bei 37°C, *R.meliloti* Kulturen bei 30°C angezogen. Aerobe Schüttelkulturen wurden bei 130 Upm in Rotationsschüttlern belüftet. Dabei waren die Anzuchtgefäße maximal bis zur Hälfte mit Medium gefüllt, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr sicherzustellen. Wenn im Text nicht anders vermerkt, wurde die Zunahme der Bakteriendichte durch Messen der Trübung bei 420 nm (A₄₂₀) in einem Zeiss Photometer verfolgt. Anaerobe Anzuchten auf festen Nährboden wurden in Gefäßen, die luftdicht verschließbar und mit einem Gas Pak System versehen waren, durchgeführt.

2.2.2. Aufnahme von Wachstumskinetiken

Die Wachstumsversuche mit den *E. coli* Cit⁺ Transformanten in Citrat-Minimalmedium wurden in 100ml Seitenarmkolbchen, die mit jeweils 50ml M9 Citrat-Minimalmedium gefüllt waren, durchgeführt. Während die aeroben Kulturen mit den üblichen Sterilstopfen versehen waren, wurden bei den anaeroben Anzuchten Seitenarmkolbchen mit Schliffstopfen verwendet. Außerdem wurde bei den anaeroben Kulturen nach dem Animpfen Sauerstoff gegen Stickstoff ausgetauscht. Für diese Versuche wurden aerobe und anaerobe Anzuchten immer parallel bei 37°C und 130 Upm kultiviert. Die Wachstumszunahme in den Seitenarmkolbchen wurde in einem Klett Photometer (Klett Mfg.Co.Inc., NY) mit Rotfilter gemessen. Eine Induktion der Citratverwertung wurde getestet, indem nicht induzierte, auf Glycerin gezogene bzw. induzierte, auf Citrat gezogene, Zellen in Citrat-Minimalmedium überimpft wurden und die Länge der "lag" Phase in Wachstumskurven gemessen wurde. Die gleiche Zellzahl (2×10^7) im Inoculum wurde strikt eingehalten.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Aufarbeitung der Zellen für Rohextrakte und Vesikelpräparationen (Hertzberg & Hinkle, 1974)

Um eine größere Menge an Zellen für eine spätere Aufarbeitung zu Vesikeln oder Rohextrakten, die dann in Enzymtests oder immunologisch untersucht werden sollten, zu erhalten, wurden Anzuchten in 500ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Da eine volle Induktion der Oxalacetat-Decarboxylase in Citrat-Minimalmedium schon unter Sauerstoffmangel gegeben ist, wurden die Anzuchtgefäße bis zum Hals mit Medium gefüllt, um die Gasaustauschfläche der Flüssigkeit gering zu halten. Nach dem Animpfen wurden die Anzuchtgefäße wieder fest mit Aluminiumfolie umwickelt und im Brutschrank

ohne Schütteln inkubiert.

Das Wachstum der Kulturen wurde durch rasches Abkühlen im Eis gestoppt und die Bakterien durch Zentrifugation (7000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet. Die Zellen wurden in 50mM Kaliumphosphat-Puffer pH7.5 suspendiert und mittels Passagieren durch die French-Press bei 10000 psi aufgebrochen. Zur Entfernung der noch intakten Zellen wurde eine weitere Zentrifugation wie oben angeschlossen. Der Überstand wurde entweder als Rohextrakt eingesetzt oder die Vesikel durch Zentrifugation (40000 Upm, 90 min, 4°C) sedimentiert. Die Vesikel wurden wie von P.Dimroth (1980) beschrieben in 50mM Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Eine Proteinbestimmung wurde nach Warburg und Christian durch Messen der optischen Dichten bei 260 und 280 nm durchgeführt (Warburg & Christian, 1942).

2.3.2. Enzymtests für Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase

Die Enzymaktivität der Oxalacetat-Decarboxylase wurde mit Vesikelpräparationen, die der Citrat-Lyase mit Rohextrakten gemessen. Enzymtests für die Oxalacetat-Decarboxylase wurden nach dem Protokoll von P.Dimroth (1981) durchgeführt. Der Aktivitätsbestimmung liegt die Reduktion des durch die Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität freigesetzten Pyruvats zu Grunde; somit wird eine Kinetik der NADH Umsetzung aufgenommen. Da in den Vesikelpräparationen oft sehr unterschiedliche Mengen an aktiver Malat-Dehydrogenase vorlagen, wurde in getrennten Versuchen die Malat-Dehydrogenase Aktivität getestet, indem keine Lactat-Dehydrogenase zu dem Reaktionsansatz gegeben wurde.

Die Citrat-Lyase Aktivität wurde nach Bergmeyer (1974) bestimmt. Die in der Vorschrift beschriebene Teilreaktion für die Bestimmung der Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität wurde weggelassen, da eine Aktivitätsbestimmung der Membran-gebundenen Decarboxylase immer in getrennten

Experimenten mit Vesikeln (s.o.) gemessen wurde.

2.3.3. Transfer von Protein auf Nitrocellulose und Immun-Fluoreszenz-anfärbung (Towbin et al. 1979; Burnette, 1981)

Die Synthese von Citrat-Lyase und Oxalacetat-Decarboxylase wurde immunologisch nachgewiesen. Nach Auftrennung der Proteinextrakte durch 9-24% SDS-Polyacrylamid Gele (Laemmli, 1970; Steiner, 1980) erfolgte elektrophoretischer Transfer der Proteinbanden auf Nitrocellulose. Der Transfer wurde in 25mM Tris, 192mM Glycin pH8.5, 20% Methanol entweder über Nacht bei 20 V oder 4 h lang bei 30 V durchgeführt. Eine anschließende Absättigung der Nitrocellulose mit Protein wurde durch Schütteln in 10mM Tris/HCl pH7.3, 0.15M NaCl 3% BSA erreicht. Danach wurde die Nitrocellulose mit in dem gleichen Puffer verdünnten Antiserum etwa eine Stunde bei 37°C und anschließend mit 1:100 verdünnten FITC-markierten Ziegen-anti-Hase-Antikörper inkubiert. Nicht gebundene spezifische und FITC-markierte Antikörper wurden durch wiederholtes Waschen in Puffer ohne BSA entfernt. Die im UV-Licht fluoreszierenden Banden, die eine Reaktion des auf Nitrocellulose gebundenen Proteins mit spezifischem Antikörper anzeigten, wurden nach Anbringen eines Gelbfilters mit HP5 Film fotografiert. Das in den Gelen nach Transfer verbliebene Protein konnte mit Coomassie G angefärbt werden.

2.4. Genetische Methoden

2.4.1. Konjugation

Für die Plasmidübertragung durch Konjugation wurden je 0,1ml der exponentiell wachsenden Kulturen von Donor- und Rezipientenzellen zu 4ml TY Medium in 100ml Erlenmeyerkolben zusammen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C bzw. 30°C, wenn *R. meliloti* als Donor diente. Durch Plattieren von jeweils 0,1ml der Bakteriensuspension auf selektive Platten wurden die Exkonjuganten von den Donorzellen abgetrennt. Zur Kontrolle wurden die Elternstämme allein wie die Konjugations-Ansätze behandelt und der gleichen Selektionsprozedur unterworfen.

2.4.2. Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA (Mandel & Higa, 1970; Cohen et al. 1972)

Zellen einer 50ml LB Kultur, die eine optische Dichte von $A_{420} = 0.8-1$ erreicht hatte, wurden in Eis gekühlt und bei 5000 Upm, 4°C, 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15ml eiskalten TC-Puffer (75mM CaCl_2 , 10mM Tris/HCl pH 7.5) aufgenommen und die Suspension 25 min im Eis belassen. Daraufhin wurden die Zellen wieder durch Zentrifugation wie oben gesammelt und in 2ml TC-Puffer konzentriert.

0,2ml dieser nunmehr kompetenten Zellen wurden zu 0,5-1,0µg DNA pipettiert, für weitere 30 min im Eis belassen und dann einem Hitzeschock von 3 min bei 42°C unterworfen. Um eine Genexpression der in die Zellen aufgenommenen DNA zu erlauben, wurde zum Transformationsansatz 2ml LB Medium gegeben und die Bakteriensuspension 30-45 min bei 37°C leicht bewegt. Je 0,1ml wurde sodann auf selektive Platten verteilt. War eine sehr niedrige Transformationseffizienz zu erwarten, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren nochmals durch Zentrifugation konzentriert.

2.4.3. Transfektion mit rekombinanter M13 Phagen DNA

Die bis zu einer optischen Dichte von $A_{420}=0.8$ angezogenen Rezipientenzellen wurden wie unter 2.4.2. gesammelt, in 15ml 50mM CaCl_2 aufgenommen, für 45 min in Eis gekühlt und nach einer zweiten Zentrifugation in 2ml 50mM CaCl_2 suspendiert. 0.2ml der kompetenten Zellen wurde zu *in vitro* ligierter Phagen-DNA pipettiert und für weitere 45 min im Eis belassen. Hierauf erfolgte ein funfminütiger Hitzeschock bei 42-44°C. Aliquote des Ansatzes wurden zusammen mit 30µl X-Gal-Lösung (2% in Dimethylformamid) und einigen Tropfen Wirtszellkultur in 3ml Weichagar eingegossen und auf LB-IPTG Platten verteilt. Nach 7-9 h oder übernacht-Bebrütung bei 37°C konnten farblose Plaques mit rekombinanten Phagen von blauen Plaques unterschieden werden.

2.4.4. *In vitro* Verpackung von λ oder Cosmid-DNA

Um λ oder Cosmid-DNA in infektiöse Phagenpartikel zu verpacken wurde jeweils 0.5-1µg DNA in T4-Ligase Puffer, die unmittelbar zuvor 10 min bei 68°C denaturiert worden war, zu den portionierten, noch tief gefrorenen "*in vitro*-packaging" Gemischen (2.6.) gegeben. Sofort nach dem Auftauen wurde durch kurzes grundliches Mischen mit einer Pipettenspitze die DNA im Extrakt verteilt. Die Verpackung der DNA erfolgte während 1 h Inkubation bei Raumtemperatur. Sodann wurde 1ml SM-Puffer (2.7.) und 50µl CHCl_3 zugesetzt und die Probe vorsichtig geschüttelt bis eine homogene Suspension vorlag. Zelldebris wurden durch 5 min Zentrifugieren in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Der klare, die infektiösen Partikel enthaltende Überstand wurde abgehoben und zur Infektion von *E.coli* Zellen eingesetzt. Bei allen *in vitro* Verpackungsversuchen wurde zur Kontrolle eine Probe ohne DNA mitgeführt und wie unter 2.4.5. getestet.

2.4.5. Infektion von *E.coli* C600 mit *in vitro* verpackter λ DNA - Test der Verpackungseffizienz

Von der in 2.4.4. erhaltenen Phagen-Lösung wurden Verdünnungsreihen in SM-Puffer angelegt und davon jeweils 0.1ml mit 0.1ml Wirtszellkultur (C600) gemischt, die in LB MgMal Medium die späte logarithmische Phase erreicht hatte. Die Infektionsansätze wurden bei 37°C im Wasserbad für 20 min inkubiert, sodann in 3ml Weichagar (LB MgMal) eingegossen und auf frisch hergestellte, vorgewarmte LB MgMal Platten verteilt. Nach Auszählen der Plaques und Berechnung des Verdünnungsfaktors wurde die Effizienz bestimmt. Es wurden Verpackungsraten zwischen 5×10^4 - 5×10^5 pfu/ μ g λ DNA erreicht.

2.4.6. Infektion von *E.coli* DH1 mit *in vitro* ligierter und verpackter Cosmid-DNA

Der Rezipientenstamm wurde zur Infektion in LB MgMal Medium bis zur späten logarithmischen Phase angezogen und dann zu je 10ml auf sterile Reagenzgläser verteilt. Etwa 0.5ml des in 2.4.4. erhaltenen Lysats mit infektiösen Partikeln wurde in die Bakteriensuspension pipettiert. Die Infektion erfolgte während einstündiger Inkubation bei 37°C. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 5000 Upm (4°C) abzentrifugiert, in 5ml LB Medium aufgenommen und nach einer weiteren Zentrifugation auf ein endgültiges Volumen von 0.5ml in LB Medium konzentriert. Die Selektion von Cosmid-enthaltenden Klonen geschah durch Ausplattieren auf frisch hergestellte LB Cm²⁰ Platten.

2.5. MNNG-Mutagenese von *K.pneumoniae*

2.5.1. Bestimmung der Überlebensraten bei verschiedenen MNNG-Konzentrationen

Zu exponentiell wachsenden Kulturen von *K.pneumoniae* wurde das in 0,2M Na-Acetat pH5.6 gelöste Mutagen MNNG (1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin) gegeben, sodaß die Endkonzentration der Chemikalie 20, 50, 100, 300 µg/ml betrug. In bestimmten Zeitabständen wurden Aliquote der Kultur entnommen und sofort in kalter Saline (1% NaCl) verdünnt um ein weiteres Einwirken des Mutagens zu verhindern. Verdunnungsreihen der Entnahmen wurden auf LB Platten verteilt. Auf diese Weise wurde die Anzahl koloniebildungsfähiger Bakterien nach unterschiedlich langer Einwirkung von MNNG ermittelt.

2.5.2. Mutagenese

Für die Mutagenese wurde zu exponentiell wachsenden *K.pneumoniae* Zellen MNNG in einer Endkonzentration von 50 µg/ml gegeben. Die Bakterien wurden 35 min dem Mutagen ausgesetzt; diese Einwirkzeit entsprach bei der gegebenen Konzentration einer Überlebensrate von 1-2,5 %. Durch Verdunnen der mutagenisierten Kultur mit fünf Volumenteilen eiskaltem LB Medium und anschließendes Waschen wurde ein weiteres Einwirken von MNNG verhindert. Die Zellen wurden daraufhin in 2ml 1xM9 Salzlosung ohne Kohlenstoffquelle aufgenommen. Aliquote davon wurden über Nacht in Glucose-Minimalmedium zur Regenerierung hochgeschüttelt. Die restliche Stammsuspension der mutagenisierten Zellen konnte im Kuhlschrank für weitere Experimente bis zu drei Wochen aufbewahrt werden.

2.5.3. Bromdesoxyuridinanreicherung zur Isolierung von anaeroben Cit⁻ Mutanten

Die in Glucose-Minimalmedium angezogenen Zellen wurden vor dem Überimpfen in Citrat-Minimalmedium in Saline gewaschen und dann in 30ml Citrat-Minimalmedium 4-6 h anaerob vorgezogen. Nach dieser Vorkultivierung wurden Uridin in einer Endkonzentration von 1mg/ml und Bromdesoxyuridin von 0.5mg/ml zugegeben und die anaerobe Kultivierung über Nacht fortgesetzt. Die Zellen wurden daraufhin durch zwei Zentrifugationen (9000 Upm, 15 min, 4°C) mit je 10ml Saline gewaschen und schließlich in 10ml Saline resuspendiert. Eine Bestrahlung der Suspension mit langwelligem UV-Licht (>300nm) für 30 min schloss sich an. Verdünnungen der Zellsuspension wurden dann auf Glucose-Minimalmedium Platten verteilt. Die überlebenden Klone wurden wie im Ergebnisteil beschrieben weiteruntersucht.

2.6. Präparation der *in vitro* Verpackungsgemische

Für die Präparation der *in vitro* Verpackungsgemische wurde nach dem Protokoll von Maniatis (1982) mit einigen geringfügigen Modifikationen vorgegangen. Die beiden *E. coli* Stämme BHB2688 und BHB2690, die sich zum vollständigen λ Hüllprotein ergänzen, wurden vor der Anzucht auf Temperatursensitivität getestet. In allen Versuchen wurde jeweils von Einzelkolonien ausgegangen. Beide Stämme wurden von Vorkulturen in je 200ml angewärmtes NZ Medium überimpft, sodaß die optische Dichte nach Inoculumzugabe etwa $A_{600} = 0.05$ betrug. Die Kulturen wurden parallel bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0.3-0.4 angezogen und die λ Proteinbiosynthese durch Zugabe von weiteren 200ml auf 65°C erwärmten NZ Medium und anschließende Inkubation bei 45°C und guter Belüftung induziert. Nach dieser 25 minütigen Hitzeinduktion wurden die Kulturen bei 38°C heftig weitergeschüttelt.

In Zeitintervallen von etwa 20 min wurde die zu erwartende CHCl_3 -Lyse getestet. Diese trat nicht wie in der Literatur beschrieben erst nach 2-3 h, sondern bereits nach 45 min bei 38°C auf. Trat CHCl_3 -Lyse innerhalb von 3 min auf, wurden die Kulturen in Eis gekühlt, vereint und abzentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 10ml CB-Puffer ohne ATP (s.u.) gewaschen und dann in 0.5-0.8ml CB-Puffer mit ATP aufgenommen. 40 μl Aliquote des Extraktes wurden in sterile vorgekühlte Eppendorfgeläße verteilt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert.

CB-Puffer (Complementation-Buffer)

40mM	Tris/HCl pH8.0
10mM	MgSO_4
1mM	Spermidin
1mM	Putrescin
7.0%	DMSO
0.1%	β -Mercaptoethanol

2.7. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen im Umgang mit DNA und RNA

TE-Puffer	10mM	Tris/HCl pH7.5
	1mM	Na-EDTA pH7.5

SM-Puffer	0.10M	NaCl
	0.01M	MgSO ₄
	0.02M	Tris/HCl pH7.5

20xSSC	3M	NaCl
	0.3M	Tri-Na-Citrat

eingestellt auf pH7.2

20xSSPE	3.6M	NaCl
	0.2M	NaH ₂ PO ₄
	20mM	Na-EDTA

eingestellt auf pH7.4

10xLoening	0.36M	Tris-Base
Puffer	0.3 M	NaH ₂ PO ₄
	0.01M	Na-EDTA

pH7.8

20xTAE	20mM	Tris-Base
Puffer	10mM	Na-acetat
	1mM	EDTA

eingestellt auf pH7.8

10xTBE	55.0g	Borsaure
Puffer	108.0g	Tris-Base
	8.3g	Na-EDTA

eingestellt auf pH8.3

10xE Puffer	0.4M	Tris-Base
(f. Elektroelution)	50mM	Na-Acetat
	10mM	Na-EDTA
eingestellt auf pH7.8		

10xRNA-Gel	200mM	MOPS
Puffer	50mM	Na-Acetat
	10mM	Na-EDTA
	6%	Formaldehyd
eingestellt auf pH8.0		

10xRNA-Gel	200mM	MOPS
Laufpuffer	50mM	Na-Acetat
	10mM	Na-EDTA
eingestellt auf pH7.0		

RNA Proben-	0.4%	Bromphenolblau
Puffer	0.4%	Xylencyanol
	2.2M	Formaldehyd
	50.0%	Formamid
	10.0%	10xGelpuffer

DNA Proben-	2mg/ml	Bromphenolblau
Puffer	1mM	Na-EDTA
	50%	Sucrose

100x Denhards	2%	Ficoll
	2%	Polyvinylpyrrolidone
	2%	BSA

Phenol/TE gesättigt: Phenol aus einer frisch geöffneten Flasche wurde dreimal mit 100mM Tris/HCl pH7.5 ausgeschüttelt und mit 0.08% 8-Hydroxychinolin stabilisiert.

2.8. Allgemeine Methoden im Umgang mit DNA

2.8.1. Fällen von DNA

Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10M LiCl und 2.5 Volumenteilen absolutem EtOH wurde DNA 15 min bei -70°C gefällt. Lagen sehr verdünnte DNA Lösungen vor, wurde t-RNA als Tragnukleinsäure beigeetzt. Durch 5 min Zentrifugieren in der Eppendorffzentrifuge bzw. 10 min bei 10000 Upm im SS34 Rotor wurde das Präzipitat pelletiert und anschließend mit 70% EtOH gewaschen. Die DNA wurde im Wasserstrahlvakuum getrocknet und in TE- oder Restriktionspuffer aufgenommen. War t-RNA zugesetzt worden, so wurde diese durch Behandlung mit RNase entfernt.

2.8.2. RNase-Behandlung von DNA-Proben

Eine RNase Stammlösung wurde in einer Konzentration von 10mg/ml in 15mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH7.5 angesetzt und die Lösung einmal 15 min auf 95°C erhitzt, um eventuell vorliegende Verunreinigungen an DNase unschädlich zu machen. Für die RNase-Behandlung wurde zu 5µg DNA etwa 2-4µl der Stammlösung pipettiert und 20-45 min bei 60°C inkubiert.

2.8.3. Phenolextraktion

Eine weitgehende Reinigung der DNA von Proteinen oder Agaroseresten wurde durch wiederholtes Ausschütteln mit einem Volumenteil TE-gesättigten Phenol erreicht. Um die Phasentrennung zu beschleunigen, wurde nach jeder Extraktion kurz zentrifugiert. Phenolreste in der wässrigen Phase wurden anschließend durch Chloroformextraktion beseitigt.

2.8.4. Restriktionsanalyse von DNA-Proben durch Agarose-Gelelektrophorese

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Zugabe von mindestens 1/7 Volumen DNA Proben-Puffer wurden die Fragmente auf 0.5-1.5% Agaroseflachbettgelen (20 x 20 cm) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte entweder über Nacht in Loeningpuffer (Loening, 1969) bei 1.5 V/cm oder in TAE Puffer bei 2.8 V/cm für 6-7 h. Zur Kontrolle von DNA Präparationen, Ligierungen und Spaltungen wurde 45-60 min lang eine Gelelektrophorese in Miniflachgelen (4 x 6.5 cm) bei 2 V/cm in TAE-Puffer durchgeführt. Agarosegele wurden mit 2.5 µg/ml Ethidiumbromid 15 min angefärbt, gründlich gewässert und mit HP5 Film bei 254nm durch einen Rotfilter fotografiert.

2.8.5. Elektroelution von DNA-Banden

Um DNA aus Agarosegelen wieder zu erhalten, wurden die Banden aus den Gelen ausgeschnitten und durch Elektroelution in 1xE-Puffer bei 7 V/cm (2-3 h) in Dialyseschläuchen aus der Gelmatrix extrahiert. Eine Adsorption der DNA an der Dialysemembran wurde durch Umpolen der Spannung für 40 sec rückgängig gemacht. Die DNA im E-Puffer wurde einer Phenolextraktion unterworfen und gefällt. Derart wiedergewonnene DNA Fragmente wurden entweder für Subklonierungen eingesetzt oder für die Erstellung von Restriktionskarten mit weiteren Restriktionendonukleasen nachgespalten. Die daraus entstehenden Spaltstücke wurden dann in einem höher prozentigen Agarosegel aufgetrennt.

2.9. Allgemeine Klonierungstechniken

2.9.1. Phosphatase-Behandlung von Vektor-DNA

Um eine möglichst hohe Ausbeute an rekombinanten DNA Molekülen zu erhalten, wurde in vielen Fällen die Vektor-DNA mit bakterieller alkalischer Phosphatase nach Herstellerangaben behandelt. Eine Inaktivierung der hitzeresistenten Phosphatase erfolgte durch mehrmalige Phenolextraktionen.

2.9.2. Ligierung mit T4-Ligase

Für die Ligierung von Insert-DNA in phosphatasebehandelte Vektormoleküle wurde ein molares Verhältnis der beiden Komponenten von 1:1, bei unbehandelter Vektor-DNA ein molares Verhältnis von Vektor:Insert = 1:4 gewählt. Anders wurde bei der Ligierung von großen DNA Molekülen in den Cosmid-Vektor verfahren: hier lag ein molares Verhältnis von Vektor:DNA = 5:1 vor. Die Ligierung wurde in 20mM Tris/HCl pH7.6, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.6mM ATP bei 4-7°C über Nacht durchgeführt.

2.10. Präparation von DNA

2.10.1. Präparation von chromosomaler DNA aus *K.pneumoniae* und *E.coli* Zellen (Vogelsang et al. 1983)

Etwa 5g *K.pneumoniae* Zellen wurden in 200ml 0.1M Tris/HCl pH7.5 aufgenommen und 30 min bei 37°C mit 300µg/ml Lysozym vorinkubiert. Nach Zugabe von 300µg/ml Pronase und 3% Na-Dodecylsarcosinat wurde die Bakteriensuspension 2 h lang bei 60°C belassen. Während dieser Zeit nicht lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min, 7000 Upm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde dreimal mit Phenol extrahiert und anschließend bei Raumtemperatur gefällt. Die ausgefallene DNA wurde auf einen Glasstab gewickelt, mit

absolutem Ethanol abgespult und im Vakuum getrocknet. Da chromosomale DNA aus *K.pneumoniae* ATCC 13882 auf Grund mit Nukleinsäure aggregierter Polysaccharide nach jedem Fallen sehr schlecht in Lösung gebracht werden konnte, wurde die DNA über einen Kaliumjodid-Gradienten weitgehend von den Zuckern des Kapselmateri als abgetrennt. Hierfür wurde die DNA in

50mM Tris/HCl pH8

10mM Na₂S₂O₅

1mM Na-EDTA

gelöst und mit genau 1.03g/ml KJ 40 h bei 40000 Upm (20°C) zentrifugiert. Das oberste Viertel - die DNA enthaltende Fraktion des Gradienten - wurde abgehoben. KJ wurde durch Dialyse gegen TE-Puffer entfernt. Nach Messen der Absorption bei 230, 260 und 280nm wurde die Ausbeute bestimmt.

Im Anschluß daran wurde die DNA Lösung über einen CsCl Gradienten ohne Ethidiumbromid, aber sonst wie unter 2.10.2. beschrieben, gereinigt. Der die DNA enthaltende Bereich des Gradienten war im Tageslicht an der Schlierenbildung zu erkennen. Dieser Teil wurde mit einer Pasteurpipette entnommen, mit TE-Puffer verdünnt und gefällt. Die in TE-Puffer gelöste DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Chromosomale DNA aus *E.coli* Zellen wurde entsprechend präpariert. Die Vorreinigung der DNA in einem KJ-Gradienten entfiel allerdings.

2.10.2. Präparative Plasmidisolierung

Eine präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus nicht amplifizierten *E.coli* Kulturen wurde nach Katz et al. (1973) durchgeführt. Die Methode beruht auf Triton-Lyse Lysozym-vorbehandelter Zellen. Zu dem erhaltenen Lysat wurde 50 μ l/ml Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) gegeben, die Lösung mit 1g/g Lysat CsCl versetzt und bei 40000 Upm, 40 h, 20°C, zentrifugiert. Die im UV-Licht fluoreszierenden Banden wurden mit Pasteurpipetten oder Einmalspritzen entnommen, 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und das Ethidiumbromid durch wiederholtes Ausschütteln mit TE-gesättigtem Isobutanol entfernt. Nach Fallen der DNA wurde diese wiederum in TE-Puffer gelöst. Die Reinheit und Ausbeute der Präparation wurde durch Messen der Absorption bei 260 und 280nm bestimmt.

Eine weitere Reinigung der Plasmid-DNA oder Auftrennung ihrer "supercoil" und "relaxed" Formen wurde mit Hilfe einer Zentrifugation durch Sucrosegradienten in Tris-Salz-Puffer (50mM Tris/HCl pH7.5, 1M NaCl, 1mM Na-EDTA) erreicht. 5-20% kontinuierliche Gradienten wurden auf ein Polster von 2ml 60% Sucroselosung in TST41 Polyallomerrohrchen gegossen. Die Gradientenrohrchen wurden mit bis 100 μ g DNA in TE-Puffer überschichtet und im Ausschwingrotor 4.5 h bei 40000 Upm (20°C) zentrifugiert. War den Sucroselosungen vorher kein 1 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt worden, sodaß die Plasmidbanden nicht im UV-Licht erkannt werden konnten, wurden die Gradienten von unten fraktioniert und Aliquote der Proben auf Agarosegelen analysiert.

2.10.3. "Minipräparationen" von Plasmid-DNA

Schnellplasmidpräparationen wurden sowohl nach Protokollen von Birnboim und Doly (1979), modifiziert von E.Beck (Heidelberg) als auch nach einer Vorschrift von Kado und Liu (1981) durchgeführt. Im Gegensatz zur erstgenannten Methode erwiesen sich Präparationen nach Kado und Liu für Restriktionsanalysen als weitgehend ungeeignet, deshalb wurde diese sehr zeitsparende Methode nur angewendet, wenn Klone auf das Vorhandensein von Plasmiden getestet werden sollten.

2.10.4. Isolierung von λ DNA (Blattner et al. 1977)

Von einer Platte mit λ Plaques auf einem Rasen des Wirtstammes C600 wurde ein Plaque abgenommen und zu 300 μ l steriler Lösung von 1% NaCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $CaCl_2$, gegeben. Dazu wurden 300 μ l einer übernachtkultur des Stammes C600 pipettiert und 10 min lang bei 37°C inkubiert, damit eine Prä-Adsorption der Phagen an die Zelloberfläche gewährleistet war. Das Phagen-Bakterien-Gemisch wurde sodann in 200ml LB mit 1mM $MgSO_4$, 1mM $CaCl_2$ überführt. Die Kultur wurde bei 37°C, 130 Upm bis zur Lyse geschüttelt. Diese erfolgte kurz nach Übergang in die stationäre Phase; die zu dem Zeitpunkt erreichte optische Dichte von $A_{420} = 1.4$ fiel innerhalb von 45 min auf $A_{420} = 0.3$ ab. Eine Titerbestimmung mit dem Indikatorstamm C600 ergab 1.2×10^{10} pfu/ml.

Nachdem nicht lysierte Zellen durch Zentrifugation (9000 Upm, 15 min) abgetrennt worden waren, wurden die im Überstand vorhandenen Bakteriophagen durch eine hochtourige Zentrifugation (18000 Upm, 4 h, 4°C) im TFA Rotor sedimentiert. Das Pellet wurde in 10ml SM-Puffer aufgenommen. Während 15 h leichten Schüttelns bei 4°C wurden die Phagen schonend im Puffer suspendiert. Nach einer DNase- und RNase-Behandlung wurde die Phagensuspension mit 0.7g/g CsCl versetzt und die Phagen durch Zentrifugation (24 h,

40000 Upm, 20°C) gebandet. Die blauliche Bande (Phagen) wurde mit einer Pasteurpipette entnommen. Nach Dialyse gegen TE-Puffer zur Entfernung des noch vorhandenen CsCl wurden mehrere Phenolextraktionen der Phagenproteinhülle vorgenommen. Die Ausbeute und Reinheit der λ DNA wurde durch Absorptionsmessung und Gelelektrophorese kontrolliert.

2.10.5. Präparative Isolierung der RF-Form von M13 Derivaten (mp18, mp19)

Der Wirtsstamm JM105 wurde zur Infektion mit M13 Phagen 3 h lang bei 37°C in 1l LB vorgezogen. Zu dieser Kultur wurden 20ml aus einer mit M13 infizierten Anzucht von JM105 Zellen und 1ml 1M CaCl₂ gegeben. Eine Vermehrung der Bakteriophagen fand während einer übernacht-Inkubation bei 37°C und guter Belüftung statt. Das Protokoll für die Präparation der RF-Form der Phagen-DNA entspricht dem der unter 2.10.2. beschriebenen Plasmid-Isolierung.

2.10.6. Einzelstrangisolierung der M13 Derivate

Die nach Transfektion (2.4.3.) erhaltenen Plaques im Bakterienrasen wurden mit sterilen Pasteurpipetten abgenommen und mit einigen Tropfen Wirtszellkultur zu 6-7ml LB Medium pipettiert. Die Phagen wurden 4.5-6 h bei guter Belüftung vermehrt. Für die Einzelstrangpräparation wurden aus diesen Anzuchten 1.5ml in Eppendorfgefäße überführt. Die Wirtszellen wurden durch zwei Zentrifugationen (15 und 5 min), wobei das erste Mal 1ml Überstand, das zweite Mal 0.8ml Überstand abgehoben wurde, gründlich abgetrennt. Zu den verbleibenden 800µl Überstand wurden 200µl einer 20% PEG6000 Lösung in 2.5M NaCl gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation wurde die PEG-Lösung vollständig vom Niederschlag entfernt. Der Niederschlag wurde in 110µl TE-Puffer (10mM Tris/HCl pH8,

1mM Na-EDTA) aufgenommen. Eine Phenolextraktion (50µl Phenol) wurde 15 min unter Schütteln vorgenommen; verbliebenes Phenol wurde anschließend durch eine Chloroform-Behandlung (100µl) entfernt. Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 3M Na-Acetat pH6 und drei Volumenteilen absolutem eiskalten Ethanol bei -70°C 15 min oder -20°C 2 h lang gefällt. Danach wurde das getrocknete Pellet in 20-30µl TE-Puffer (10mM Tris/HCl pH8, 0.1mM Na-EDTA) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.11. Präparation von Gesamt-RNA aus Subklon DH1/Sc1 (Chirgwin et al. 1979, Maniatis et al. 1982)

Bei Arbeiten mit RNA wurden, um die Präsenz der nahezu ubiquitären RNasen zu verhindern, folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen: Alle Glaswaren wurden einige Stunden bei 180°C sterilisiert, Puffer wurden autoklaviert oder steril filtriert. Des weiteren wurden alle Handgriffe mit Handschuhen durchgeführt.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden Zellen des Subklons DH1/Sc1 in 1l LB Medium, das mit 2% IPTG und 50mg/l Ampicillin supplementiert worden war, bis zu einer optischen Dichte von $A_{420}=0.9$ angezogen. Die Zellen wurden im Eis-Kochsalz-Bad rasch abgekühlt, durch Zentrifugation (7000 Upm, 10 min, 0°C) gesammelt und in 50mM Tris/HCl pH8, 10mM Na-EDTA Puffer gewaschen. Der Niederschlag wurde in 25ml des gleichen Puffers aufgenommen und CsCl in einer Endkonzentration von 0.35M zugegeben, damit isotonische Bedingungen vorlagen. Die Suspension wurde sodann mit 50mg Lysozym versetzt und 30 min im Eis belassen. Daraufhin wurde das Spharoplastengemisch in 50ml Lysepuffer (6M Guanidiniumthiocyanat, 0.025M Na-Citrat pH7, 0.5% N-Lauroylsarcosinat, 0.3% Antifoam A, 0.7% β -Mercaptoethanol) eingerührt. Lyse der Zellen erfolgte innerhalb weniger Sekunden. Durch 1 min Rühren in einem "Waring Industrial Blendor" (Stufe II)

wurden die großen DNA Moleküle mechanisch zerstört. In der nun klaren, nicht mehr viskosen Flüssigkeit wurden 0.4g/ml CsCl gelöst und davon etwa jeweils 20-25ml auf 8ml eines 5.7M CsCl Polsters in 0.1M Na-EDTA pipettiert. Die Zentrifugation wurde in einem TST 28 Ausschwingrotor bei 20000 Upm und 20°C (24 h) durchgeführt. Die auf diese Weise von DNA und Protein weitgehend abgetrennte, sedimentierte RNA wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen im Wasserstrahlvakuum in 2ml Tris-SDS-Puffer (50mM Tris/HCl pH8, 0.5% SDS) aufgenommen. Während 1 h Inkubation bei 42°C mit 100µg/ml Proteinase K wurde restliches Protein verdaut. Die Suspension wurde danach einer jeweils fünfminütigen Phenol- und Chloroformextraktion unterworfen. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 2M Na-Acetat pH6 und 2.5 Volumenteilen Ethanol wurde die RNA 30 min bei -70°C gefällt. Der weißliche RNA Niederschlag wurde in 70% Ethanol gewaschen, im Exsiccator getrocknet und in 2ml H₂O aufgenommen. Sofort im Anschluß daran wurde die Probe erneut gefällt und so bei -20°C aufbewahrt.

2.12. Übertragung von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose-Filter bzw. GeneScreen Membranen

2.12.1. Übertragung von DNA auf Nitrocellulose (Southern, 1975)

Um einen effizienten Transfer der DNA von Agarosegelen auf Nitrocellulose zu erreichen, wurden die Gele zuerst 2 x 7 min lang mit 0.25M HCl geschüttelt und dann die DNA durch 2 x 15 min Alkalibehandlung (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) denaturiert. Eine Neutralisierung erfolgte während insgesamt 30 min Inkubation in 0.5M Tris/HCl pH7.5, 1.5M NaCl Puffer; auch diese Lösung wurde einmal gewechselt. Nach der Vorbehandlung des Gels wurde die DNA in 20xSSC-Puffer durch Kapillarkräfte auf Nitrocellulose übertragen. Die Nitrocellulose wurde anschließend 2 h bei 80°C gebacken.

2.12.2. Übertragung von RNA aus Formaldehydgelen auf GeneScreen Membranen (Bittner et al. 1980)

10-50 µg RNA wurden nach dem Fallen in 5-10 µl sterilem Wasser aufgenommen und mit vier Volumenteilen Probenpuffer 5 min bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden kurz im Eis abgekühlt und dann auf Formaldehydgelen aufgetrennt (Lehrach et al. 1977). Die Formaldehydgele wurden wie Agarosegele hergestellt: zu der auf 60°C abgekühlten Agaroselosung wurde die entsprechende Menge 10x Gelpuffer pipettiert, Formaldehyd wurde zu einer Endkonzentration von 6% zugegeben. Die Gele wurden darauf sofort gegossen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V 6 h lang in Flachbettgelapparaturen durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich nur eine sehr dünne Schicht Puffer über den Gelen befand. Nach Elektrophorese wurden die in den Gelen aufgetrennte RNA Präparation ohne vorheriges Anfärben durch "Elektro-Transfer" in 25mM NaH₂PO₄ pH6.5 analog zum Transfer von Protein auf Nitrocellulose (2.3.3.) auf GeneScreen Membran übertragen. Während für die ersten 90 min des Transfers nur eine Spannung von 10 V (= 50-200 mA) eingestellt war, wurde für den zweiten Teil des Transfers eine Spannung von 70 V (= 600 mA - 1 A) angelegt. Die GeneScreen Membran wurde danach kurz mit Laufpuffer abgespült und 3 h bei 90°C gebacken. Nach erfolgtem Transfer wurden die Gele angefarbt. Formaldehydgele wurden vor dem Färben gründlich gewässert und dann mit 2.5 µg/ml Ethidiumbromid unter leichtem Schütteln 2 h lang oder über Nacht gefarbt. Ein Entfärben der Gele wurde durch 1-2 h Schütteln in Wasser erreicht.

2.13. Hybridisierung filtergebundener DNA

Vor Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Proben wurden die Nitrocellulosefilter durchwegs 2-4 h lang bei 40°C in Hybridisierungspuffer unter leichtem Schütteln vorinkubiert. Die als Trager-DNA verwendete Kalbsthymus-DNA wurde durch Aufkochen vor Zugabe denaturiert.

Hybridisierungspuffer: 5x SSPE
 0.2% SDS
 50µg/ml beschallte Kalbsthymus-DNA

Generell wurden für Hybridisierungen je nach Größe der Filter zwischen $0.5-4 \times 10^6$ cpm/Filter eingesetzt.

2.13.1. Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Plasmiden

Die durch Nick-Translation radioaktiv markierten Plasmide oder DNA Fragmente wurden bei Raumtemperatur 5 min in 0.3M NaOH denaturiert, mit verdünnter Salzsäure und 1M Tris/HCl pH7.5 neutralisiert und zusammen mit 5-20ml Hybridisierungspuffer zu den vorinkubierten Nitrocellulosefiltern gegeben. Die Hybridisierung der stets homologen Proben erfolgte während 24-40 h bei 56°C. Danach wurden die Filter zweimal in 2xSSPE, 0.2% SDS und einmal abschließend in 2xSSPE ohne SDS 10-15 min bei 56°C gewaschen. Auf den Filtern noch vorhandene Waschflussigkeit wurde sorgfältig abgetupft, die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und auf X-Ray 90 Röntgenfilmen (Linhardt, München), teilweise mit Verstärkerfolie (Quanta III, Fa. DuPont), exponiert.

2.13.2. Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Oligonukleotiden

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden ohne vorherige Denaturierung zu den vorinkubierten Nitrocellulosefiltern gegeben. Da die eingesetzten Oligonukleotide durchwegs aus einem Gemisch entarteter Ketten bestanden,

wurde der Bereich der theoretischen Hybridisierungs-Temperatur gemäß der nachstehenden Formel berechnet:

$$N_{G/C} \times 4 + N_{A/T} \times 2 = \text{Hybridisierungs-Temperatur}$$

Für die maximale Hybridisierungs-Temperatur wurde die größtmögliche Anzahl von G/C Basen, für die minimale Hybridisierungs-Temperatur die größtmögliche Anzahl von A/T Basen in die Formel eingesetzt. Zu Beginn der Hybridisierung wurde eine Temperatur eingestellt, die der maximalen Hybridisierungstemperatur + 5°C entsprach. Wenn im Text nicht anders angegeben, wurde die Temperatur in Abständen von 9-15 h um jeweils 5°C reduziert bis eine Temperatur erreicht war, die 10°C unter der minimalen Hybridisierungstemperatur lag. Bei dieser Temperatur wurden die Filter anschließend zweimal in 5xSSPE, 0.2% SDS und einmal in 5xSSPE ohne SDS gewaschen. Die Filter wurden wie oben beschrieben exponiert.

2.14. Hybridisierung filtergebundener RNA

GeneScreen Membranen mit gebundener RNA wurden 16-20 h bei 42°C in RNA-Hybridisierungspuffer vorinkubiert, danach mit frischem Puffer und der radioaktiven, denaturierten Probe versetzt und 48 h bei 42°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Filter wurden nach der Hybridisierung kurz mit 2xSSC Puffer abgespult und dann 2 x 15 min in 2xSSC, 1% SDS bei 65°C gewaschen. Hatte sich herausgestellt, daß die Waschbedingungen zu wenig stringent waren, wurde ein weiteres Mal 15 min in 0.1xSSC bei 70-80°C gewaschen.

RNA-Hybridisierungspuffer

5x	SSC
5x	Denhards (siehe 2.7.)
120mM	Na-Phosphat pH7,2
5mM	Na-EDTA
1 %	N-Lauroylsarcosinat
0.1%	SDS
50 %	Formamid
100µg	Trager-DNA (Kalbsthymus)
/ml	

2.15. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

2.15.1. Markierung von Plasmiden durch Nick-Translation
(Rigby et al. 1977)

Zu 0,5-1µg Plasmid-DNA in 1x Markierungspuffer wurde 5µl (50µCi) $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP und 25 Einheiten Kornberg-Polymerase pipettiert. Der enzymatische Einbau des radioaktiven Nukleotids fand während 3 h Inkubation bei 18°C statt. Durch anschließendes Passagieren des Reaktionsansatzes durch eine 1ml Sephadex G50 Säule bei 1000 Upm (5 min) und einmaliges Waschen der Säule mit 100µl TE-Puffer wurden freie Nukleotide abgetrennt. Die Effizienz der Markierung wurde durch Messen der Cerenkov Strahlung festgestellt.

5x Markierungspuffer:	0.5M	Tris/HCl pH7,5
	50 mM	MgCl ₂
	0.5mM	dTTP
	0.5mM	dGTP
	0.5mM	dATP

2.15.2. Markierung von synthetischen Oligonukleotiden durch Polynukleotidkinase (PNK) - Behandlung

Zwischen 15 und 20 pMol Oligonukleotidgemisch wurde zu einer äquimolaren Menge $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (5000 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$) in 1xPNK Puffer gegeben. Für die terminale Markierung der synthetischen DNA wurden sechs Einheiten Polynukleotidkinase eingesetzt und der Ansatz 45 min bei 37°C inkubiert. Da die Effizienz der Markierung je nach verwendetem Oligonukleotidgemisch stark variierte, wurde durch Binden der radioaktiven Nukleotide auf DE 81 Papier der Einbau getestet (Maniatis et al. 1982).

Zusammensetzung des 5xPNK Puffers

100mM	MgCl ₂
50mM	DTT
700mM	Tris/HCl pH7.6

2.16. Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von D.Oesterhelt hergestellt und durch RP-HPLC gereinigt. Das Abspalten der Trityl-Schutzgruppe erfolgte 15 min lang in 80% Essigsäure bei Raumtemperatur. Zur Lösung wurde ein Volumenteil 0.1M Triethylammoniumacetat-Puffer gegeben. Die Oligonukleotidlösung wurde daraufhin dreimal mit jeweils einem Volumenteil Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde entnommen und das Wasser in der Vakuumzentrifuge abgezogen. Der Rückstand wurde einer wiederholten Methanolbehandlung unterworfen, um Salzreste des Puffers zu entfernen. Nachdem das Lösungsmittel in der Vakuumzentrifuge abgezogen war, wurde das Oligonukleotidgemisch in Wasser aufgenommen und portioniert bei -20°C aufbewahrt. Der Portionierung war eine Ausbeutebestimmung durch Aufnehmen eines UV-Spektrums vorausgegangen.

Um während der Synthese eventuell erfolgte Kettenabbrüche zu erkennen, wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotidgemische vor dem Einsetzen in Hybridisierungsexperimente zuerst zusammen mit Oligonukleotiden bekannter Größe auf 20% Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Nach Autoradiographie wurde der Syntheseansatz kontrolliert.

Zusammensetzung der 20% Polyacrylamid-Harnstoff-Gele:

42.0g	Harnstoff
66.7ml	29% Acrylamid, 1% Bisacrylamid
5.0ml	10xTBE Puffer (siehe 2.7.)
50 μ l	TEMED
2.0ml	10mg/ml Peroxodisulfat
ad	100ml H ₂ O

Die Ausmaße der Gele betrugen 0.1 x 20 x 40 cm. Die Elektrophorese erfolgte 4 - 5 h bei 1200 V.

2.17. DNA Sequenzierung

DNA wurde nach der von Sanger beschriebenen Methode (Sanger et al. 1977) gemäß dem Amersham Protokoll mit $\alpha^{35}\text{S}$ dATP durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden auf 200 x 400 x 0.2 mm große 8% Harnstoffgele aufgetragen. Um die Sequenzierungen möglichst weit lesen zu können, wurden die Ansätze zumeist auf zwei Gelen - 2 h und 4 h lang - bei 34 W aufgetrennt.

2.18 Gewinnung von Antikörpern aus Kaninchen

2.18.1. Immunisierung

100-200 μ g Protein, das in 500 μ l Wasser gelöst war, wurde mit 500 μ l komplettem Freund'schem Adjuvans gründlich gemischt und den Kaninchen subkutan injiziert. Den Tieren war vorher etwa 10ml Blut für die Gewinnung von Nullserum entnommen worden. Nach sechs Wochen wurden die Kaninchen mit weiteren 200 μ g Protein, allerdings diesmal in inkomplettem Freund'schen Adjuvans, geboostert. Die Blutabnahme erfolgte dann zehn Tage danach.

2.18.2. Serumgewinnung

Das abgenommene Blut (etwa 30ml) wurde zunächst einige Stunden bei Raumtemperatur belassen und dann nach vorsichtigem Ablosen des Blutkuchens von der Gefäßwand über Nacht im Kuhlschrank aufbewahrt. Durch zwei Zentrifugationen bei 4000 Upm für 20 min und 1 h am folgenden Tag wurde das Serum vom Blutkuchen getrennt, abgehoben und bei -20°C aufbewahrt. Das Serum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase konnte 1:200, das gegen die Citrat-Lyase dagegen nur 1:50 verdünnt werden, um noch ein positives Signal mit dem Antigen zu erhalten.

2.19 Immuno-Test von *E.coli* Transformanten

Ziel dieser Versuche war, mit Hilfe des immunologischen Nachweises jene Klone aus einer Subklon-Genbank zu identifizieren, die auf Grund des in das Expressionsvektorensystem pIN-III-A ligierten DNA Fragmentes die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase synthetisierten. Hierfür wurden die Ampicillin resistenten Transformanten zunächst auf Ampicillin-Platten vorgezogen und dann mit einem Mikrotiterstempel auf Nitrocellulose-Filter

übertragen, die 6-8 h auf Ampicillin-IPTG-LB-Platten zur Induktion der Bakterien inkubiert wurden.

Durch funfminütiges Auflegen der Nitrocellulose-Filter auf mit 0.1N NaOH getranktes Whatman 3MM Papier wurden die Zellen lysiert. Zur Neutralisierung wurden die Filter anschließend wiederholt auf Whatman 3MM Papier, das mit PBS-Puffer getrankt war, gelegt und dann 1 h bei 37°C getrocknet. Um eine Absattigung der Filter mit Protein zu erreichen wurden diese 2 x 1.5 h mit PBS-2% BSA-Puffer bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Nitrocellulose wurde sodann kurz mit Puffer gespült und mit 3-5ml Antiserumlösung versetzt, die aus PBS-Puffer mit 1% BSA, 0.5% Nonidet und 1:100 verdünntem Antiserum bestand. Eine Bindung der Antikörper an die auf der Nitrocellulose fixierten Antigene konnte während einer Übernacht-Inkubation bei 37°C stattfinden. Unspezifisch adsorbierte Antikörper wurden durch 2 x 20 min Waschen in PBS-Puffer mit 0.1% Triton X100 entfernt.

Antikörper, die mit Protein aus einzelnen Kolonien reagiert hatten, wurden durch Anfarben mit FITC-markierten Ziege-anti-Hase Antiserum sichtbar gemacht. Analog zu den Immun-Fluoreszenz Versuchen (2.3.3.) wurden die FITC-markierten Ziegenantikörper 1:100 in PBS-1%BSA-Puffer verdünnt. Nach einer 45 minütigen Einwirkzeit bei 37°C unter leichtem Schütteln wurden die Filter zweimal in PBS-Puffer mit 0.1% Triton X100 gewaschen und fluoreszierende "Kolonien" im UV-Licht fotografiert.

PBS-Puffer:	8mM	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O
	2mM	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O
	140mM	NaCl
eingestellt auf pH7.2		

D. ERGEBNISSE

1. Versuche zur Isolierung der Gene der Oxalacetat-Decarboxylase durch Mutagenese

1.1. Versuch zur Klonierung durch Komplementation Mutagenese-induzierter Defekte

Das Enzym Oxalacetat-Decarboxylase (drei Untereinheiten: $\alpha=65\text{kD}$, $\beta=34\text{kD}$, $\gamma=12\text{kD}$; Dimroth & Thomer, 1983) vermittelt zusammen mit der Citrat-Lyase (drei Untereinheiten: $\alpha=54\text{kD}$, $\beta=32\text{kD}$, $\gamma=10\text{kD}$; Dimroth et al. 1977) anaerobe Citratverwertung bei *K.pneumoniae*. Mutanten von *K.pneumoniae*, die eine funktionelle Oxalacetat-Decarboxylase nicht mehr synthetisieren können, sollten demnach an ihrem Unvermögen Citrat zu fermentieren, also einem anaeroben Cit⁻ Phänotyp, zu erkennen sein. Zu Beginn der Arbeit bot sich deshalb an, durch chemische Mutagenese Mutanten von *K.pneumoniae* mit einer defekten Oxalacetat-Decarboxylase zu erzeugen. Die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase sollten durch *in trans* Komplementation der Mutanten mit *K.pneumoniae* Wildtyp-DNA erhalten werden.

1.1.1. Isolierung von anaeroben Cit⁻ Mutanten nach chemischer Mutagenese

Als mutagenes Agens wurde MNNG (1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin), das Mehrfachmutationen während der DNA Replikation verursacht, gewählt (Cerdeña-Olmedo et al. 1968; Oeschger & Berlyn 1974). Unter Wachstumsbedingungen in Vollmedium wurde für MNNG eine minimale Hemmkonzentration

von 50 µg/ml ermittelt. Exponentiell wachsende Zellen von *K. pneumoniae* wurden 35 min mit 50 µg/ml MNNG geschüttelt. Diese Zeit entsprach bei der gegebenen MNNG Konzentration einer Überlebensrate von 1-2.5%. Durch Verdünnen der Mutageneseansätze mit Vollmedium wurde ein weiteres Einwirken der mutagenen Chemikalie verhindert. Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben regeneriert. Nach negativer Selektion durch Bromdesoxyuridinbehandlung während anaerober Kultivierung in Citrat-Minimalmedium und anschließender UV-Bestrahlung wurden die überlebenden Zellen weiteruntersucht. Auf diese Weise waren jene Mutanten angereichert worden, die anaerob mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle nicht gewachsen waren und demnach kein Bromdesoxyuridin aufgenommen hatten.

Da neben Defekten in den Enzymen der Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase auch Mutationen in den Citrat-Transportgenen, denen der H⁺ATPase, der gemischten Säuregärung und vielen Regulationsgenen einen anaeroben Cit⁻Phänotyp hervorrufen können, wurden die angereicherten Cit⁻Klone physiologischen Untersuchungen unterzogen. Gesucht waren Zellen, die folgende Eigenschaften besaßen:

- a) aerobes Wachstum auf Citrat, um Mutationen im Citrat-Transportsystem auszuschließen,
- b) aerobes und anaerobes Wachstum auf Glucose ohne externen Elektronenakzeptor um Auxotrophien und Mutationen in der ATPase auszuschließen,
- c) anaerobes Wachstum auf Pyruvat, um Mutationen in der gemischten Säuregärung auszuschließen und letztlich
- d) Wachstum auf Zuckern wie Maltose, Mannitol, deren Verwertung der Katabolit-Repression unterliegt (Perlman & Pastan, 1969; Pastan & Adhya, 1976), um Mutationen in diesen Genen auszuschließen.

Von 284 Kolonien, die nach Bromdesoxyuridinbehandlung erhalten worden waren und einen anaeroben Cit⁻Phänotyp aufwiesen, entsprachen sechs dem gewünschten Phänotyp. Um zu beweisen, daß diese Mutanten wirklich einen Defekt in der

Oxalacetat-Decarboxylase bzw. Citrat-Lyase besaßen, wurden die Zellen für Enzymtests angezogen. Die Schwierigkeit bestand darin, Mutanten mit anaeroben Cit-Phänotyp unter induzierenden Bedingungen, nämlich anaerob mit Citrat als Kohlenstoffquelle zu züchten. Für die Anzucht der Mutanten wurde deshalb dem Citrat-Minimalmedium 20mM Na-Pyruvat als "Hilfskohlenstoffquelle" zugegeben. Bei Wildtyp-Zellen ließ sich in diesem Medium die Synthese der Oxalacetat-Decarboxylase genauso gut wie in reinem Citrat-Minimalmedium induzieren.

Die Ergebnisse der Enzymtests für Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase sind in Tab.1 festgehalten. Den ermittelten Daten liegen jeweils drei verschiedene Anzuchten und Präparationen zu Grunde, da die Enzymaktivitäten bei verschiedenen Präparationen teilweise erheblich voneinander abwichen. In der Aufstellung ist der Bereich der Schwankung (minimaler und maximaler Wert) angegeben. Nachdem für einige Mutanten die Reversionsraten untersucht worden waren, konnten die Abweichungen zu höherer Enzymaktivität mit einer Reversion zum ursprünglichen anaeroben Cit⁻ Phänotyp erklärt werden. Wie aus Tab.1 zu ersehen ist, zeigen fünf von sechs Mutanten sowohl eine reduzierte Oxalacetat-Decarboxylase wie verminderte Citrat-Lyase Aktivität. Nur Mutante F stellt eine Ausnahme dar; sie besitzt eine mit dem Wildtyp vergleichbare Enzymaktivität für die Oxalacetat-Decarboxylase, dagegen eine drastisch verringerte Citrat-Lyase Aktivität. Bei Mutante T9-8 fällt auf, daß die Mutation in weit stärkerem Maße die Aktivität der Oxalacetat-Decarboxylase beeinträchtigt als die der Citrat-Lyase.

Tab.1: Spezifische Enzymaktivität von Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase gemessen mit anaeroben Cit⁻Mutanten und *K.pneumoniae* Wildtyp-Zellen

Klon	Oxalacetat-Decarboxylase [U/mg]		Citrat-Lyase [U/mg]	
	Min.	Max.	Min.	Max.
A4-8	0.0001-0.0608		0.0217-0.0355	
A12-1	0.0344-0.0875		0.0147-0.0219	
F	0.5094-0.5471		0.0370-0.0623	
C21-7	0.0079-0.1635		0.0148-0.0220	
E22-1	0.0001-0.0655		0.0120-0.0164	
T9-8	0.0459-0.0847		0.2784-0.5420	
Wildtyp	0.6215-0.6884		0.7500-0.8046	

Max. bzw. Min. kennzeichnet den jeweils maximalen bzw. minimalen gemessenen Wert.

Die Resultate der Enzymtests bestätigten sich bei den meisten Mutanten durch den immunologischen Nachweis von Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase. Proteinextrakte, deren Aktivität vorher in Enzymtests untersucht worden war, wurden durch Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, anschließend elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen und mit Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase inkubiert. Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase reagierte nur mit der α Untereinheit des Enzyms und das gegen die Citrat-Lyase nur mit den Untereinheiten α , β des Enzyms. In Abb.2 und 3 zeigt die Immun-Fluoreszenzanfärbung für die Mutanten A4-8, A12-1, E22-1 und C21-7 das völlige Fehlen der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase sowie der α und teilweise auch β Untereinheit der Citrat-Lyase. Proteinextrakt aus Mutante F dagegen reagierte

mit den Antisera beider Enzyme. Diese Versuche geben allerdings nur Aufschluß über die Synthese der Untereinheiten, nicht über vorliegende inaktivierende Mutationen. Daraus folgt, daß im Gegensatz zu den Mutanten A4-8, A12-1, E22-1 und C21-7 bei Mutante F die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase und die α sowie β Untereinheit der Citrat-Lyase synthetisiert werden. Da die Mutanten nur als Rezipienten für die Wildtyp-Citrat-Fermentationsgene eingesetzt werden sollten, wurde die Charakterisierung der Klone nach diesen Ergebnissen eingestellt.



Abb.2: Immun-Fluoreszenzanfärbung der Vesikelpräparationen einiger MNNG- und Tn5-Mutanten mit Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase. Die mit dem Serum reagierende α Untereinheit des Enzyms ist angezeigt. In jeder Bahn sind etwa 50 μ g Vesikelprotein aufgetragen. a) Wildtyp, b) MNNG-Mutante E22-1, c) MNNG-Mutante C21-7, d) Tn5-Mutante T03-1, e) MNNG-Mutante A4-8, f) MNNG-Mutante A12-1, g) Tn5-Mutante Tg1, h) MNNG-Mutante F

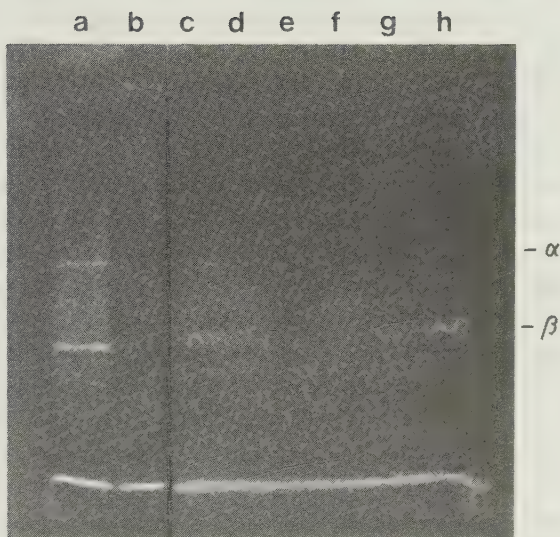


Abb.3: Immun-Fluoreszenzanfärbung der Rohextrakte einiger MNNG- und Tn5-Mutanten mit Antiserum gegen die Citrat-Lyase. Die mit dem Serum reagierende α und β Untereinheit des Enzyms sind gekennzeichnet. Bei der sehr intensiv fluoreszierenden untersten Bande, die sich etwa auf der Höhe der Lauffront befindet, handelt es sich wahrscheinlich um eine Reaktion mit Lipopolysacchariden mit dem Antiserum. In jeder Bahn sind etwa 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

a) Wildtyp, b) MNNG-Mutante E22-1, c) Tn5-Mutante Tg1, d) MNNG-Mutante A12-1, e) MNNG-Mutante A4-8, f) Tn5-Mutante T03-1, g) MNNG Mutante C21-7, h) MNNG-Mutante F

1.1.2. Versuche zur Komplementation einer Cit⁻Mutante mit Wildtyp-DNA

In Vorversuchen waren für den *K.pneumoniae* Stamm ATCC 13882 geeignete Transformationsbedingungen erarbeitet worden. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß Zellen für die Transformation in zuckerfreiem LB Medium angezogen wurden, um eine ausgeprägte Kapselbildung aus Polysacchariden zu unterdrücken und damit eine drastische Reduktion der Transformantenausbeute zu verhindern. Die zu Beginn sehr niedrigen Transformationsausbeuten mit aus *E.coli* Zellen präparierter pBR322 Plasmid-DNA konnten erheblich gesteigert werden, nachdem pBR322 DNA aus *K.pneumoniae* Zellen isoliert worden war. Offensichtlich wurde die aus *E.coli* erhaltene Plasmid-DNA auf Grund eines in *K.pneumoniae* ATCC 13882 vorliegenden Restriktionssystems nach Transformation effizient abgebaut. Mit Wildtyp *K.pneumoniae* Zellen wurde eine Transformationseffizienz von 1.5×10^3 Transformanten/ μ g pBR322 erhalten. Die Transformationsraten lagen für Cit⁻Mutanten um einen Faktor 2 tiefer. Sehr schlechte Transformationsausbeuten zeigte die stabilste Cit⁻Mutante E22-1 mit rekombinanten pBR322 Molekülen. Für Komplementationsversuche wurde deshalb eine andere Mutante (Klon A12-1) gewählt, die mit einer Rate von 5×10^{-6} zum anaeroben Cit⁺Phänotyp revertierte. Diese Mutante war mit rekombinanten pBR322 Plasmiden ähnlich gut wie der Wildtyp zu transformieren.

Da sich sowohl Wildtyp-Zellen als auch Mutanten durch eine hohe natürliche Ampicillin-Resistenz auszeichneten, konnte die durch pBR322 vermittelte β Lactam-Resistenz nicht genutzt werden. Es wurden daher Klonierungen in die *Pst* I Schnittstelle des Ampicillin-Gens durchgeführt und Transformanten über die Tetracyclin-Resistenz selektiert.

Auf Grund der Beobachtung, daß alle anaeroben Cit⁻Mutanten, die eine defekte Oxalacetat-Decarboxylase

aufwiesen, gleichzeitig eine stark reduzierte Citrat-Lyase besaßen, bestand die Möglichkeit einer gemeinsamen Transkriptionseinheit für die Gene beider Enzyme. Eine polycistronische m-RNA wurde nach Berechnung der Strukturgenlängen aller Untereinheiten über die bekannten Molekulargewichte etwa 6000 Nukleotide betragen. Um gegebenenfalls die ganze Einheit zu klonieren, wurden *Pst* I Partialverdau der *K.pneumoniae* Wildtyp-DNA mit einer durchschnittlichen Größe von 5-10kb in pBR322 ligiert und die Mutante A12-1 transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf M9 Citrat-Minimalmedium Platten mit 5mg/l Tc verteilt und sechs Tage anaerob inkubiert. Zur Kontrolle wurden Aliquote der Transformationsansätze auf Tc²⁰ LB Platten verteilt und aerob inkubiert, um die Transformantenausbeute festzustellen.

Nach Extrapolation der Kontrollversuche mit Tc^r Transformanten wurden insgesamt 10000 Transformanten auf anaerobe Citratverwertung getestet. Etwa 100 Kolonien konnten Citrat wieder fermentieren. Diese Klone wurden vermehrt und die Zellen zu Plasmidminipreparationen aufgearbeitet. Das Plasmidmuster der Transformanten wurde durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Über 50% der isolierten Klone enthielten rekombinante Plasmide. Diese wurden in einer zweiten Transformation der Cit⁻Mutante A12-1 eingesetzt. Da sich diesmal allerdings keine Cit⁺Transformanten isolieren ließen, ist davon auszugehen, daß die Plasmide nicht die gesuchten Gene trugen. Es ist unwahrscheinlich, daß es sich bei allen Cit⁺Derivaten von Mutante A12-1 um spontane Revertanten handelte; eine Reversionsrate von 5×10^{-6} spricht dagegen. Eine andere Erklärung erscheint jedoch plausibel: die isolierten Cit⁺Transformanten von Mutante A12-1 hatten mit dem Plasmid die den Defekt komplementierenden Gene erhalten. Diese waren allerdings auf Grund der bei Stamm ATCC 13882 beobachteten hohen Rekombinationsfrequenz sofort ins Chromosom integriert. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Plasmid-Analyse der Cit⁺Transformante Nr.16.

Vergleicht man eine Plasmidprparation der ständig auf Citrat gehaltenen Zellen von Nr.16 mit jener aus Zellen einer aeroben Kultivierung auf Vollmedium, so zeigte die "anaerobe" Prparation keine Plasmidbanden, während Multimere von rekombinanten pBR322 Molekulan in der "aeroben" Prparation vorlagen. Eine Hybridisierung der auf Nitrocellulose übertragenen DNA mit ^{32}P -markiertem pBR322 verdeutlichte das Ergebnis (Abb.4). In Bahn b ("aerobe Plasmidprparation") hybridisierte pBR322 mit verschiedenen Plasmidbanden, die in Bahn c nicht vorhanden sind. Hier zeigt aber die Hybridisierung mit pBR322-DNA Fragmente von sehr hohem Molekulargewicht an, die als Reste der in Plasmidminiprparationen häufig noch vorliegenden chromosomalen DNA interpretiert wurden.

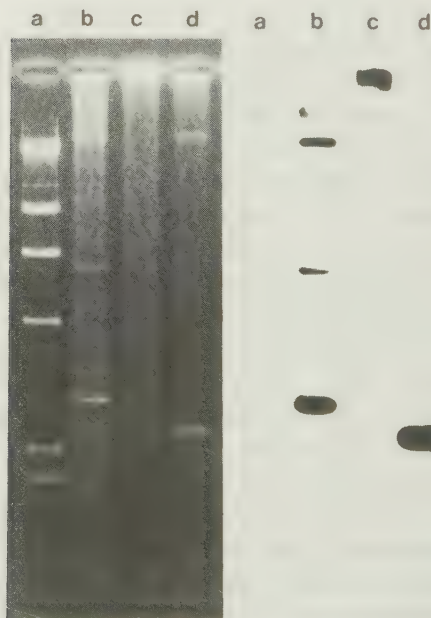


Abb.4: Ergebnis der Hybridisierung auf Nitrocellulose übertragener DNA aus Klon Nr.16 mit ^{32}P -markierter pBR322 Plasmid-DNA.

- a) DNA Marker
(λ H₁ndIII)
- b) "aerobe Plasmidprparation"
- c) "anaerobe Plasmidprparation"
- d) pBR322 (Kontrolle)

Eine entsprechende Instabilität nach Anzucht ohne Selektionsdruck wurde bei einer weiteren Cit⁺ Transformante von Mutante A12-1 beobachtet. Offensichtlich integrierte unter Selektionsdruck das gesamte Plasmid durch homologe Rekombination in die chromosomale DNA. Sobald kein Selektionsdruck mehr bestand, desintegrierten Bruchstücke des Plasmids mit den pBR322 Anteilen, um wieder als autonomes Plasmid zu existieren.

Der *K.pneumoniae* Stamm ATCC 13882 war auf Grund seiner im Vergleich zu anderen *K.pneumoniae* Stämmen hohen Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität für die Mutageneseexperimente gewählt worden. Zu Beginn der Versuche stand auch keine Möglichkeit zur Verfügung *RecA* Mutationen in *K.pneumoniae* einzuführen, die eine Rekombination homologer DNA Fragmente weitgehend unterdrückt hatten. Nachdem sich der *K.pneumoniae* Stamm ATCC 13882 als Rezipient für homologe, rekombinante DNA Moleküle als derart ungeeignet erwiesen hatte, wurden die Versuche, die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase über Komplementation *in trans* zu isolieren, abgebrochen.

1.2. Versuche zur Markierung der Gene durch Transposon Tn5 Mutagenese

Im Folgenden sollten die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase durch das Transposon Tn5 inaktiviert und markiert werden. Aus Transposon Mutanten sollte das Transposon mit den flankierenden DNA Bereichen isoliert und das Transposon durch geeignete Restriktionsspaltungen von den Strukturgen-Anteilen entfernt werden. Diese können als homologe Hybridisierungsproben für eine Cosmid-Genbank mit Wildtyp *K.pneumoniae* DNA dienen.

1.2.1. Insert-Inaktivierung der Citrat-Fermentationsgene durch Tn5 Mutagenese

Das Transposon Tn5 wurde durch Konjugation von *Rhizobium meliloti* 53B1 nach *K.pneumoniae* ATCC 13882 gebracht. Dabei fand ein von U.Priefer und A.Puhler zur Verfügung gestelltes Konjugationssystem Anwendung. Der *R.meliloti* Stamm 53B1 besitzt ein Km^rRP4 (RP4-4) Derivat, das für die Mobilisierung eines kryptischen, Tn5::Mob enthaltenden Plasmids benötigt wird. Da das kryptische Plasmid in Enterobakterien nicht repliziert wird, ist das Transposon "gezwungen" ins Chromosom der Exkonjugante oder - mit viel geringerer Häufigkeit - auch in RP4-4 zu springen.

Aus Vorversuchen hatte sich ergeben, daß *R.meliloti* 53B1 nicht in der Lage ist, auf M9 Minimalmedium Platten mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Exkonjuganten von *K.pneumoniae*, die das Transposon erhalten hatten, konnten daher durch Ausplattieren der Konjugationsansätze auf M9 Citrat-Km^r Minimalmedium Platten selektiert werden. In Tab.2 sind die Konjugationsraten wiedergegeben. Die im Versuch eingesetzte Anzahl von Donorzellen wurde durch Ausplattieren der Sm^r Rhizobien auf TY Sm^r Platten, die der Rezipientenzellen durch Ausplattieren auf

Citrat-Minimalmedium Platten ermittelt.

Tab.2: Konjugations- und Tn5-Mobilisierungsraten von
R.meliloti 53B1 (Donor) und *K.pneumoniae* ATCC 13882

Donorzellen	Rezipientenzellen	Transfer-Rate	
<i>R.meliloti</i>	<i>K.pneumoniae</i>	RP4-4	Tn5
7×10^7	1×10^{10}	3.2×10^4	3.5×10^3

In der Tabelle ist jeweils die Bakterienanzahl/ml angegeben.

Von 3.2×10^4 Exkonjuganten/ml, die über die durch RP4-4 vermittelte Tetracyclin-Resistenz erkannt worden waren, hatten 3.5×10^3 Zellen/ml gleichzeitig das Transposon erhalten, waren also Km^r . Eine derartige Mobilisierungsrate von etwa 10% ist ungewöhnlich hoch. Häufig werden nur Frequenzen von ca. 1% erreicht (U.Priefer, personl. Mitteilung).

Ungefähr 3500 Km^r Exkonjuganten wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Citrat anaerob zu verwerten. Bei Klonen, die anaeroben Cit⁻Phänotyp aufwiesen, wurde wie bei den MNNG-Mutanten der Substratabbau von Glucose und Pyruvat im Anaeroben und von Katabolit-regulierten Zuckern im Aeroben untersucht. Schließlich wurden fünf Mutanten isoliert, die eine stark reduzierte Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität besaßen. Mutante T03-1 und TC2-2 zeigten zusätzlich eine drastisch verminderte Citrat-Lyase Aktivität. Dagegen war bei Mutante TD18-2, Tg1 und Td1 wie bei der MNNG-Mutante T9-8 (1.1.1.) eine wesentlich geringere Beeinträchtigung der Citrat-Lyase Funktion zu beobachten. Die Ergebnisse der Enzymtests sind in Tab.3 festgehalten. Bei Klon T03-1 und

Tg1 wurde der Ausfall der Enzymsynthese durch die Mutation mittels Immun-Fluoreszenzanfärbung analysiert. Aus Abb.2 und 3 ist ersichtlich, daß bei Mutante Tg1 noch Untereinheiten der Enzyme Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase synthetisiert werden, allerdings kann es sich hier auch um Revertanten handeln. Im Gegensatz zu den MNNG-Mutanten zeigten sich nämlich Tn5-Mutanten als wesentlich instabiler. Die Reversionsraten lagen bis auf eine Ausnahme um 10^{-4} . Die stabilste Mutante mit einer Reversionsrate um 10^{-5} wurde mit T03-1 bezeichnet. Diese Mutante wurde für die Isolierung des Tn5 enthaltenden DNA Fragmentes herangezogen.

Tab.3: Spezifische Aktivität von Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase der anaeroben Cit-Transposon Mutanten und Wildtyp-Zellen

Klon	Oxalacetat-Decarboxylase [U/mg]		Citrat-Lyase [U/mg]	
	Min.	Max.	Min.	Max.
T03-1	0.0214	0.1160	0.0161	0.0254
Tg1	0.0830	0.1538	0.2871	0.3431
TD18-2	0.0710	0.0910	0.5062*	
Td1	0.0687	0.4231	0.4287*	
TC2-2	0.0699	0.3330	0.0324*	
Wildtyp	0.6062	0.6890	0.7560	0.8047

* : für die Bestimmung der Citrat-Lyase Aktivität wurde hier nur eine Messung durchgeführt, die Werte für die Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität wurden wie bei allen anderen Messungen in drei getrennt erfolgten Anzuchten und Enzymtests ermittelt.

Es wurden jeweils die maximal und minimal erhaltenen Werte aufgeführt (Max., Min.).

1.2.2. Klonierung des Tn5 enthaltenden DNA Fragmentes aus Mutante T03-1

Aus Mutante T03-1 wurde DNA präpariert und mit Restriktionsendonuklease *Eco* RI gespalten. Da Transposon Tn5 keine *Eco* RI Erkennungsstelle besitzt (Jorgensen et al. 1979), sollte auf diese Weise das ganze Transposon mit den angrenzenden DNA Abschnitten aus *K.pneumoniae* erhalten werden. Die geschnittene chromosomale DNA wurde in mit *Eco* RI geöffneten und Phosphatase-behandelten pBR322 ligiert. Transformationsansätze des Rezipientenstammes K802NR wurden, um sofort die gesuchten Klone mit Tn5 in pBR322 zu erkennen, auf Ap^r, Km^r LB Platten ausgestrichen. Nach Selektion auf Ap^r, Km^r wurde Klon K802NR/pBR322::Tn5 isoliert, der auch die Tetracyclin-Resistenz aufwies. Plasmid DNA wurde aus diesem Klon präpariert und mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten. Es stellte sich heraus, daß pBR322 etwa 15kb Insert-DNA enthielt, nach Substraktion des Transposon-Anteils also ca. 9-10kb *K.pneumoniae* DNA. Eine Abtrennung dieser DNA von Tn5 und pBR322, mit dem Ziel, bei einer anschließenden Koloniehybridisierung eine Kreuzreaktion mit dem Cosmid-Vektor zu vermeiden, wurde unterlassen, da in Parallelversuchen inzwischen die Citrat-Fermentationsgene aus *K.pneumoniae* kloniert worden waren.

2. Klonierung der Oxalacetat-Decarboxylase Gene durch Expression in *E.coli* Cosmid-Klonen

2.1. Isolierung von drei Citrat verwertenden *E.coli* Klonen aus einer Cosmid-Genbank mit *K.pneumoniae* DNA

Chromosomale DNA von *K.pneumoniae* wurde mit Restriktionsendonuklease *Bam* HI partiell abgebaut. Die DNA Fraktion, deren mittlere Fragmentgröße 30-50kb entsprach, wurde in den mit *Bam* HI gespaltenen Cosmid-Vektor pSUP205 ligiert (Simon et al. 1983). Diesen Vektor stellte U.Priefer vom Lehrstuhl für Genetik in Bielefeld zur Verfügung. Das pBR325 Derivat trägt in die *Pst* I Erkennungsstelle des Ap^r Gens kloniert die *cos* Region. Nach *in vitro* Verpackung der rekombinanten Cosmide in λ Phagenpartikel und Infektion des *E.coli* Rezipientenstammes DH1 wurden etwa 600 Cm^r Transduktanten erhalten. Ursprünglich war die Genbank für Koloniehybridisierungsversuche mit den aus Tn5-Mutante T03-1 präparierten DNA Proben erstellt worden. Diese Experimente wurden nicht durchgeführt, nachdem die im folgenden Abschnitt beschriebenen unerwarteten Ergebnisse in Parallelversuchen erhalten worden waren.

Aerobe und anaerobe Citratverwertung aller Klone der Cosmid-Genbank wurde durch Übertragung der Kolonien mit Hilfe eines Mikrotiterstempels auf Citrat-Minimalmedium Platten getestet. Nach zwei bis sieben Tagen Bebrütung bei 37°C wurden drei *E.coli* Klone isoliert, die in der Lage waren, Citrat abzubauen. Während zwei davon - DH1/Cit1 und DH1/Cit2 - nur aerob Citrat verwerteten, wuchs Klon DH1/Cit3 auch anaerob auf Minimalmedium Platten mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle.

2.2. Untersuchung der drei Cit⁺ *E.coli* Klone

2.2.1. Vergleich der Restriktionsmuster der isolierten Cosmide

Aus den drei Cit⁺ *E.coli* Klonen wurde Plasmid-DNA im präparativen Maßstab hergestellt und Restriktionsanalysen unterworfen. Abb.5 zeigt die mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* HI, *Eco* RI, *Hin* dIII und *Pst* I gespaltenen Cosmide. In den Bahnen a-c sind die *Bam* HI Verdauungen der Plasmide pES1 (aus DH1/Cit1), pES2 (aus DH1/Cit2) und pES3 (aus DH1/Cit3) aufgetragen. Die Vektorbande mit etwa 8.5kb ist angegeben. Da beim *Bam* HI Abbau der Cosmide pES1 und pES3 eine weitere Bande der gleichen Größe von ca.10kb erhalten worden war, lag zuerst die Vermutung nahe, daß dieses Fragment beiden Plasmiden zueigen war. Doppelspaltungen der Plasmide mit *Bam* HI, *Eco* RI und *Bam* HI, *Hin* dIII ergaben jedoch keine gemeinsamen Spaltprodukte. Somit ist davon auszugehen, daß die genetische Grundlage für den Cit⁺ Phänotyp in keinem der drei Isolate identisch ist. Durch Größenbestimmung der Fragmente nach verschiedenen Restriktionsspaltungen wurden die Insertlängen der drei Cosmide bestimmt. Für pES1 wurde eine Insertlänge von 16kb, für pES2 eine von 6kb und für pES3 eine Insertlänge von etwa 33kb ermittelt. Wie aus Abb.5 zu ersehen ist, erbrachten alle Restriktionsspaltungen von Plasmid pES3 eine heterogene Fragmentpopulation. Einige der Banden sind deutlich überrepräsentiert, während andere Abbauprodukte anscheinend in geringerer Konzentration vorliegen. Dies waren die ersten Hinweise für die später immer wieder beobachtete Instabilität des Plasmids pES3. Unter 2.2.4. wird ausführlicher hierauf eingegangen.



Abb.5: Spaltung der Cosmide pES1 (aus DH1/Cit1), pES2 (aus DH1/Cit2) und pES3 (aus DH1/Cit3) mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Bahn a,d,g,j,: Plasmid pES1; Bahn b,e,h,k,: Plasmid pES2; Bahn c,f,i,l,: Plasmid pES3; Bahn m: Marker-DNA (λ Hind III gespalten)

2.2.2. Wachstumseigenschaften der drei Cit⁺ *E. coli* Klone in Citratmedium

Das Wachstumsverhalten der Cit⁺ *E. coli* Isolate wurde nun charakterisiert und die Induzierbarkeit der Citratverwertung durch Vorkultivierung der Zellen in einem nicht induzierenden Medium bzw. in induzierendem Citratmedium untersucht. Die Klone DH1/Cit1-3 wurden parallel in M9 Minimalmedium mit entweder 40mM Glycerin oder 20mM Na-Citrat, also unter nicht induzierenden bzw. induzierenden Bedingungen angezogen. 1×10^7 Zellen dieser Vorkulturen wurden sodann in M9 Minimalmedium mit Citrat als Kohlenstoffquelle überimpft. Bei Zellen des Klons DH1/Cit3 wurde auch eine anaerobe Kultur angelegt. Da die Kultivierung der Bakterien in Seitenarmkolbchen erfolgte, mußten zur Messung der optischen Dichte keine Zellen entnommen werden.

Abb.6 gibt das Wachstumsverhalten der drei Klone wieder. Sowohl die induzierte als auch die auf Glycerin vorgezogene Kultur des Isolats DH1/Cit1 trat unmittelbar in die logarithmische Wachstumsphase ein (Abb.6A). Dieses Ergebnis deutet auf ein konstitutiv exprimiertes Citrat-Transportsystem hin. Beide Kulturen von DH1/Cit2 zeigten unabhängig von der Art der Vorkultur eine kurze "lag" Phase (Abb.6A). Dies kann daran liegen, daß die Vorkulturen schon die stationäre Phase erreicht hatten und deshalb erst eine gewisse "Regenerierungszeit" der Zellen vonnöten war. Da allerdings kein Unterschied in der Länge der "lag" Phase zwischen induzierter und nicht induzierter Kultur zu beobachten war, ist anzunehmen, daß auch hier keine induzierbare Citrat-Verwertung vorliegt.

Anders verhielten sich Kulturen des Klons DH1/Cit3 (Abb.6B). Auf Citrat vorgezogene Zellen gingen ohne "lag" Phase im Aeroben wie im Anaeroben zu exponentiellem Wachstum über. Eine ausgedehnte "lag" Phase von ca. 40 h zeigte die auf Glycerin vorgezogene Kultur in aerobem Citratmedium. Als noch viel signifikanter den Beginn des Wachstums verzögernd

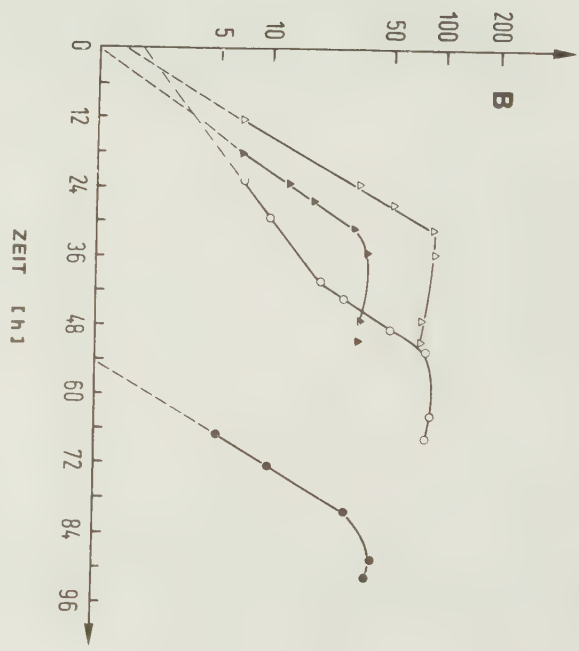
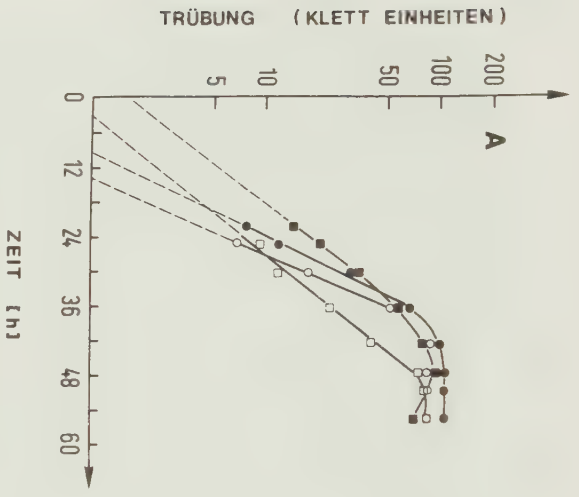


Abb. 6: Wachstumsverhalten der drei Cit⁺ *E. coli* Transformanten (DH1/Cit1, DH1/Cit2, DH1/Cit3) in M9 Minimalmedium mit Citrat als einziger Kohlenstoffquelle. Die Zellen waren in M9 Minimalmedium mit Glycerin (nicht induziert) bzw. mit Citrat (induziert) vorgezogen worden. Von diesen Vorkulturen waren 1×10^7 Zellen in 50ml Citrat-Minimalmedium überimpft worden.

(A) Wachstum von Klon DH1/Cit1: □ induzierte Kultur, ■ nicht induzierte Kultur; Wachstum von Klon DH1/Cit2: ○ induzierte Kultur, ● nicht induzierte Kultur. (B) Wachstum von Klon DH1/Cit3, induzierte Zellen wurden sowohl aerob (△) als auch anaerob (▲) in Citrat-Minimalmedium kultiviert. Entsprechend wurde das Wachstum nicht induzierter Zellen im Aeroben (○) wie im Anaeroben (●) beobachtet.

erwiesen sich die zuerst nicht induzierenden Bedingungen für die anaerobe Kultur von Transformante DH1/Cit3. Erst nach einer "lag" Phase von fast drei Tagen (66 h) begannen die Zellen Citrat anaerob abzubauen und exponentiell zu wachsen. Die mit diesen Versuchen erhaltenen Resultate sprechen für eine induzierbare Citratverwertung bei Klon DH1/Cit3.

Die Generationszeiten der Cit⁺-Klone in Citratmedium wurden bestimmt. Für Klon DH1/Cit1 wurde eine Generationszeit von 7 h, für Klon DH1/Cit2 eine von 5 h und für DH1/Cit3 im Aeroben wie im Anaeroben eine Generationszeit von 5,5-6 h ermittelt. Die Verdopplungszeit von *K.pneumoniae* betrug in Citratmedium unter aeroben Bedingungen 60 min und unter anaeroben 90 min (Abb.7).

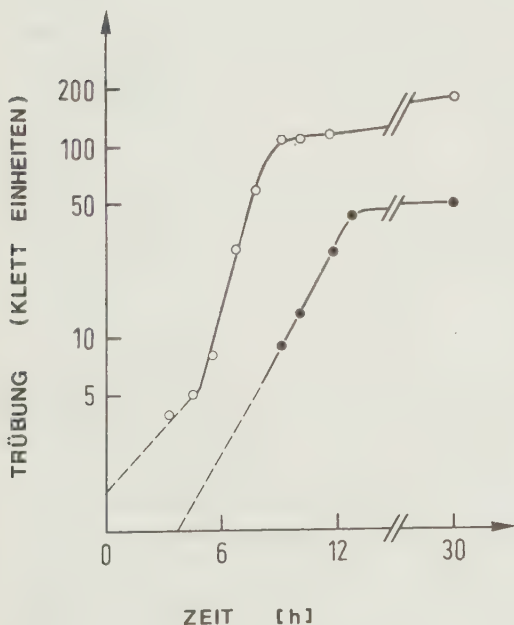


Abb.7: Wachstum von *K.pneumoniae* ATCC 13882 in M9 Citratmedium. Die Zellen waren von aerob bebrüteten Citratplatten in 50ml Flüssigmedium überimpft worden.
[o] aerobe Kultur
[•] anaerobe Kultur

2.2.3. Nachweis des Cosmid-kodierten Cit⁺Phanotyps durch Transformationsexperimente

Um zu beweisen, daß die isolierten Plasmide den Cit⁺Phanotyp kodieren, wurden diese wieder in den ursprünglichen Rezipienten DH1 und den *E.coli* *RecA*⁺ Stamm K802NR transformiert. Selektion von Transformanten erfolgte durch Ausplattieren der Transformationsansätze auf Citrat-Minimalmedium Platten, bei Transformationsversuchen mit Plasmid pES3 wurden die Platten parallel aerob und anaerob bebrütet. Zur Kontrolle wurden Aliquote der Transformationsansätze auf LB Cm^r Platten verteilt und die Transformantenausbeuten bestimmt.

Alle Transformanten des Plasmids pES1 mit DH1 und K802NR als Rezipienten waren in der Lage, Citrat abzubauen. Weniger als 1% der parallel durch Cm^r Selektion bestimmten Transformantenzahl zeigten Cit⁺Phanotyp durch Plasmid pES2 und etwa 1-5% durch Plasmid pES3. Mit Plasmid pES3 wurden durch anaerobe Selektion auf Citrat allerdings bis zu 20% der gesamten Cm^r Transformantenzahl Cit⁺Klone erreicht. Diese Erhöhung des den Cit⁺Phanotyp besitzenden Transformantenteils nach anaerober Inkubation kann mit der Induzierbarkeit der Citrat-Fermentationsgene durch Citrat im Anaeroben erklärt werden. Während im aeroben Stoffwechsel Citrat schnell über die Enzyme des Citrat-Zyklus veratmet wird, konnte die interne Citrat-Konzentration unter fermentativen Bedingungen, die ein "Umlaufen" des Tricarbonsaure-Zyklus durch einen Block zwischen α -Ketoglutarat und Succinat verhindern (Amarasingham & Davis, 1965), ansteigen. Auf diese Weise sollte eine erhöhte interne Citrat-Konzentration die Synthese der anaeroben Citratabbauwege induzieren. Daß allerdings dennoch nicht alle Cm^r Transformanten unter anaeroben Bedingungen auf Citrat-Platten wuchsen, lag wahrscheinlich an der im Folgenden beschriebenen hohen Segregationsrate des Plasmids pES3.

2.2.4. Instabilität von Cosmid pES3

Für Plasmid-Präparationen von pES3 aus Transformante DH1/Cit3 wurden die Bakterien wie üblich in Vollmedium gezüchtet und dann weiterverarbeitet. Da sich Cosmid-DNA von Plasmid pES3 nur in geringer Ausbeute herstellen ließ, wurden wiederholt Plasmid-Präparationen durchgeführt. Auffallend bei den anschließenden Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen war, daß die zu Beginn nur leicht unterrepräsentierten Banden mit jeder Präparation unscheinbarer wurden und schließlich ganz verschwanden. Das Auftreten von "Neben"- und "Hauptbanden" beruhte weder auf unvollständigem Abbau mit den verwendeten Restriktionsenzymen noch auf Sternaktivitäten. Mittels Auftrennen der verschiedenen ungespaltenen Plasmidspezies über einen Sucrosegradienten und anschließender Fraktionierung wurde das Vorliegen einer heterogenen Plasmid-Population deutlich. In Abb.8 sind die einzelnen Fraktionen des Sucrosegradienten nach Auftrennen über ein 0.5% Agarosegel gezeigt. Die "supercoil" und "relaxed" Formen des Hauptplasmids sind gekennzeichnet. Unterhalb der Bande der "relaxed" Form des Hauptplasmids sind mehrere unterrepräsentierte Plasmidbanden zu sehen. Eine davon stellt wahrscheinlich die "supercoil" Form eines größeren Plasmids dar.

Da sich der Anteil der unterrepräsentierten Spezies nach jeder Passage der Zellen auf Vollmedium verringerte, wurde auf den ursprünglichen, durch anaerobe Selektion auf Citrat isolierten Klon zurückgegriffen. Die Zellen wurden auf Citrat-Minimalmedium Platten im Anaeroben vermehrt und zu Plasmidminipräparationen verarbeitet. In Bahn b der Abb.9 ist die Plasmid-Präparation dieser permanent anaerob auf Citrat kultivierten Zellen aufgetragen, in Bahn a die des selben Klon, der aus Glycerinkultur auf Citrat-Minimalmedium Platten ausgestrichen worden war. Offensichtlich verwerten die Zellen aus Glycerinkultur zuerst das mit ausgestrichene Glycerin-Vollmedium-Gemisch und dieses kurze,

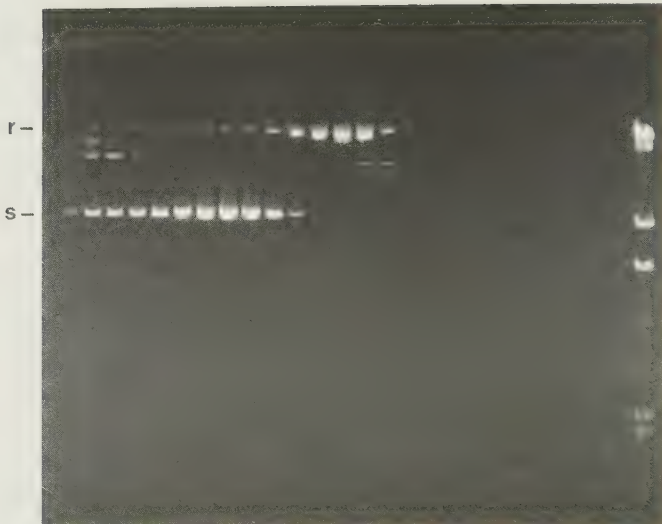


Abb.8: Ergebnis der Auftrennung der heterogenen Plasmidpreparation des Klons DH1/Cit3 über einen Sucrosegradienten. Aufgetragen sind von links nach rechts die einzelnen Fraktionen des von unten fraktionierten Gradienten (links = unten im Gradientenröhrchen, rechts = oben im Gradientenröhrchen). "r" steht für "relaxed" Form. "s" steht für "supercoil" Form.

vorübergehende Angebot einer anderen Kohlenstoffquelle genügt für den einsetzenden Abbau der Plasmid-DNA. Nur ständig auf Citrat im Anaeroben, also unter Selektionsdruck, gehaltene Kulturen von DH1/Cit3 besaßen ein großes Plasmid, das nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen kein heterogenes Bandenmuster mehr ergab.

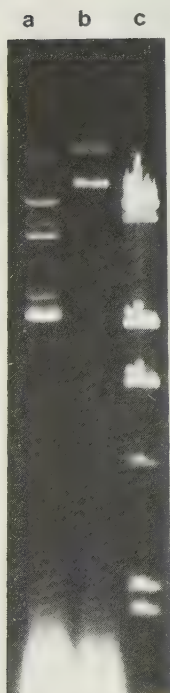


Abb.9: Vergleich der Plasmidminiprparationen von unterschiedlich vorkulti-vierten Zellen des Klons DH1/Cit3.

a) Plasmidminiprparation von DH1/Cit3 Zellen, die aus Glycerinkultur auf Citratplatten anaerob vermehrt worden waren (Zusammensetzung der Glycerinlösung: 50% Glycerin, 50% LB Medium)

b) Plasmidminiprparation von DH1/Cit3 Zellen, die permanent anaerob auf Citratplatten kultiviert worden waren.

c) λ DNA *Hin* dIII

Die Ursache für eine derartig hohe Segregationsrate des Plasmids wurde untersucht. Da sich das vollständige Plasmid (pES3) vom abgebauten (pES31) nur durch das Vorhandensein von mehr Restriktionsfragmenten unterschied, konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß die in pES3 zusätzlich vorliegende DNA aus dem verbleibenden Insert desintegrierte. Des weiteren fluoreszierte die Vektorbande von pES3 nach *Bam* HI Spaltung ein wenig intensiver im UV-Licht als die anderen Fragmentbanden (Abb.5). Diese Beobachtungen deuteten auf die Existenz von zwei Vektormolekülen im Plasmid pES3 hin. Die Frage ließ sich durch Hybridisierungsversuche mit dem ³²P-markierten Cosmid-Vektor pSUP205 beantworten. DNA von pES3 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I, *Bgl* II und *Bst* EII gespalten. *Pst* I schneidet den Vektor zweimal, für *Bgl* II und *Bst* EII sind dagegen keine Erkennungsstellen im Vektor vorhanden. Die Proben wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und die DNA aus den Gelen auf Nitrocellulose übertragen. Abb.10 veranschaulicht das Ergebnis der Hybridisierung mit ³²P-markiertem pSUP205. Insgesamt fünf Fragmente aus dem *Pst* I Abbau von pES3 und jeweils zwei Fragmente aus dem *Bgl* II und *Bst* EII Verdau hybridisierten mit dem Vektor. Damit war die in Abb.11 gezeigte Anordnung von Insert- und Vektoranteilen bewiesen. Offensichtlich erhöhen zwei Vektoreinheiten mit jeweils einem Replikationsursprung (*ori*) in *cis* wesentlich die Instabilität des Plasmids. Da nur durch Kultivierung in Citrat-Minimalmedium das große Insert mit 23kb im Plasmid erhalten blieb, war davon auszugehen, daß die Citrat-Fermentationsgene auf diesem Teil lagen. Bestand dieser Selektionsdruck nicht, zerfiel das Plasmid zum kleineren Abbauprodukt pES31.

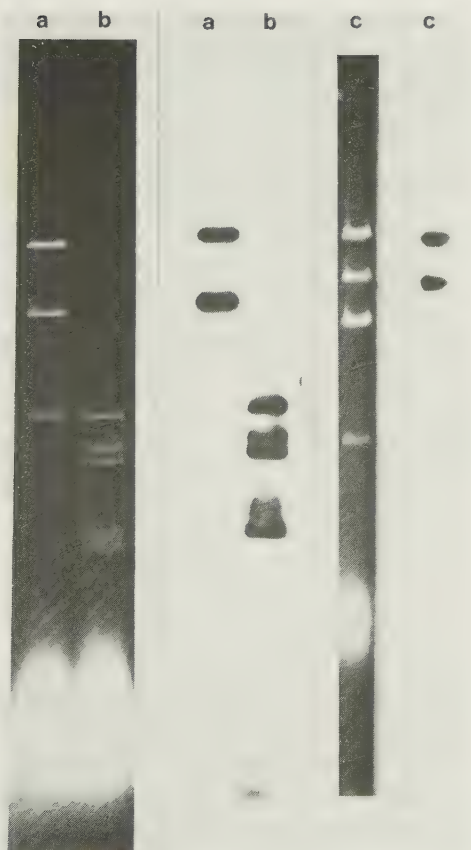


Abb.10: Hybridisierung der nach *Bgl* II, *Pst* I und *Bst* EII Abbau erhaltenen Restriktionsfragmente von Plasmid pES3 mit dem Cosmidvektor pSUP205. a) *Bgl* II Spaltung, b) *Pst* I Spaltung, c) *Bst* EII Spaltung

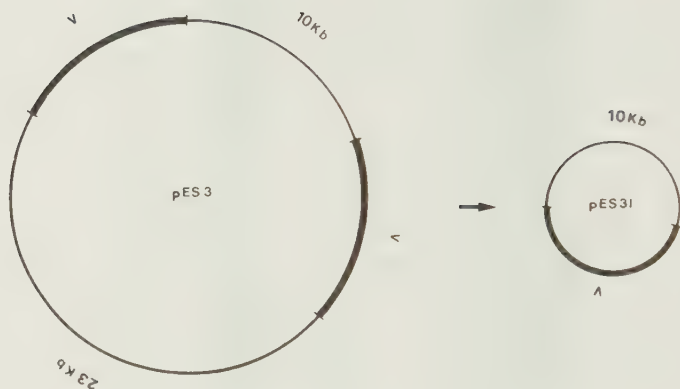


Abb.11: Anordnung von Insert- und Vektoranteilen in pES3.

2.3. Nachweis der durch Plasmid pES3 vermittelten Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität

Um die Existenz einer Plasmid-kodierten Oxalacetat-Decarboxylase nachzuweisen, wurden die drei *Cit⁺ E. coli* Klone unter Sauerstoffmangel-Bedingungen in Citratmedium für eine spätere Aufarbeitung zu Vesikeln und Rohextrakten angezogen. Als Kontrolle wurde der plasmidfreie Rezipientenstamm DH1 mit angezuchtet. Da der *Cit⁻*-Kontrollstamm unter identischen Bedingungen kultiviert werden sollte, wurde in diesem Fall Pyruvat neben Citrat als Kohlenstoffquelle dem Medium zugefügt.

Die präparierten Vesikel wurden in Enzymtests für die Oxalacetat-Decarboxylase eingesetzt. Das Ergebnis faßt Tab.4 zusammen. Wie zu erwarten war, besaßen die nur aerob Citrat verwertenden Klone DH1/*Cit1* und DH1/*Cit2* wie der Rezipient DH1 keine Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität. Die

angegebenen niedrigen Aktivitaten von bis zu 7% der *K.pneumoniae* Wildtyp-Enzymaktivitat sind zu vernachlassigen, da sie im Bereich des experimentellen Fehlers liegen.

Tab.4: Oxalacetat-Decarboxylase Aktivitat der Cit⁺ *E.coli* Transformanten und *K.pneumoniae* Wildtyp-Zellen

Klon	[U/mg]	%
<i>K.pneumoniae</i>	0.7761	100
<i>E.coli</i> DH1	0.0361	5
<i>E.coli</i> DH1/Cit1	0	0
<i>E.coli</i> DH1/Cit2	0.0574	7
<i>E.coli</i> DH1/Cit3	0.2763	35

Eine Oxalacetat-Decarboxylase Enzymaktivitat, die etwa 30% der bei *K.pneumoniae* ermittelten erreichte, wurde mit Vesikeln von Klon DH1/Cit3 gemessen. Dieses Ergebnis ließ sich durch den immunologischen Nachweis des Enzyms mittels Immun-Fluoreszenzanzufärbung bestätigen. Protein der Klone DH1/Cit1 und DH1/Cit2 reagierte nicht mit Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase. Dagegen zeigt Spur d der Abb.12 die fluoreszierende Bande der α Untereinheit des Enzyms. Hier war Vesikelprotein aus einer auf Citrat gezogenen Kultur von DH1/Cit3 aufgetragen. In LB Medium oder in M9 Glucose-Minimalmedium gezüchtete Zellen (Spur b und c) wiesen dagegen keine Synthese der Oxalacetat-Decarboxylase auf. Obgleich einige Generationen Kultivierung unter nicht selektiven Bedingungen schon einen einsetzenden Zerfall des Plasmids hervorrufen, kann aus diesen Versuchen dennoch geschlossen werden, daß die Synthese der Oxalacetat-Decarboxylase der Induktion durch Citrat unterliegt.

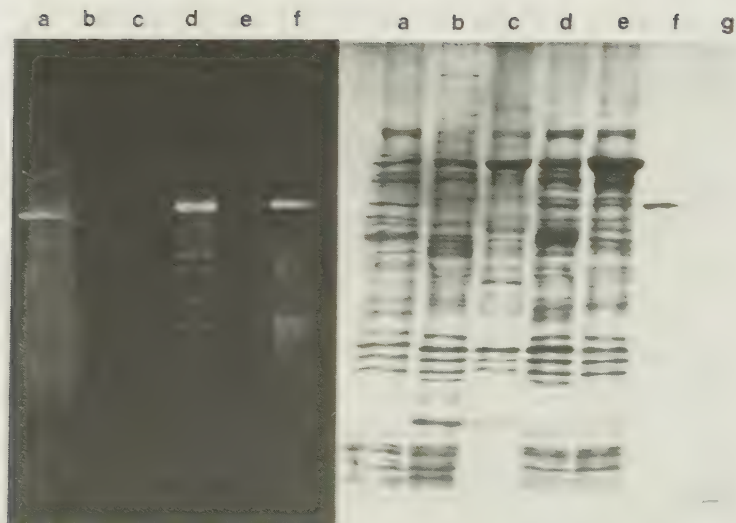


Abbildung: Immun-Fluoreszenzanalyse von Proteinextrakten von *E. coli* Klon DH1/Cit3 und *M. pneumoniae* ATCC 13682 mit Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase.

a) Vesikelprotein aus *M. pneumoniae* Zellen, die in Citratmedium gezogen worden waren, b-d) Vesikelprotein von DH1 Cit3 Zellen, die in LB Medium (b), in M9 Glucosemedium (c) und M9 Citratmedium (d) gezüchtet worden waren, e) Vesikelprotein des plasmidfreien Rezipienten DH1 gezüchtet in M9 Minimalmedium mit Pyruvat und Citrat als Kohlenstoffquelle, f) gereinigtes Enzym Oxalacetat-Decarboxylase (von P. DiMarco zur Verfügung gestellt) g) Marker-Proteingemisch

2.4. Immunologischer Nachweis der durch pES3 vermittelten Citrat-Lyase

Nachdem sich aus den Versuchen mit MNNG- und Tn5-Mutanten ergeben hatte, daß alle Mutanten neben einer stark reduzierten Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität auch eine verminderte Citrat-Lyase Aktivität aufwiesen, war die Möglichkeit einer genetischen Kopplung beider Gene gegeben. Eine durch pES3 kodierte Citrat-Lyase sollte deshalb untersucht werden. Da *E.coli* Zellen nun eine eigene von *K.pneumoniae* etwas unterschiedliche Citrat-Lyase synthetisieren, wurde an Stelle von Enzymtests, die ohnehin keine eindeutige Aussage zugelassen hatten, nur der immunologische Nachweis geführt.

In Spur b und e von Abb.13 ist das von P.Dimroth zur Verfügung gestellte gereinigte Enzym der Citrat-Lyase aufgetragen. In Spur c und f wurde Protein von *E.coli* Zellen aufgetrennt, die in Minimalmedium mit Glucose und Citrat anaerob gezüchtet worden waren. Die Aufnahme von Citrat in die Zellen war durch Abnahme der Citratkonzentration im Medium von P.Dimroth nachgewiesen worden. Somit sollte bei diesen *E.coli* Zellen die Synthese der Citrat-Lyase induziert sein (Dagley, 1954) und die Reaktion des Rohextrakts mit Antiserum gegen das Enzym als Kontrolle für eine Kreuzreaktion dienen. In Spur c, d, f und g (Abb.13) wurden etwa 50µg Gesamtprotein aufgetragen. Während der Proteinextrakt von Klon DH1/Cit3 (Bahn g) sehr stark mit dem Antiserum reagierte, ist bei der Kontrolle (Bahn f) eine nur sehr schwache Kreuzreaktion des Antiserums mit der β Untereinheit der Citrat-Lyase aus *E.coli* zu beobachten. Offensichtlich kodiert das Plasmid pES3 neben der Oxalacetat-Decarboxylase auch die Citrat-Lyase aus *K.pneumoniae*.

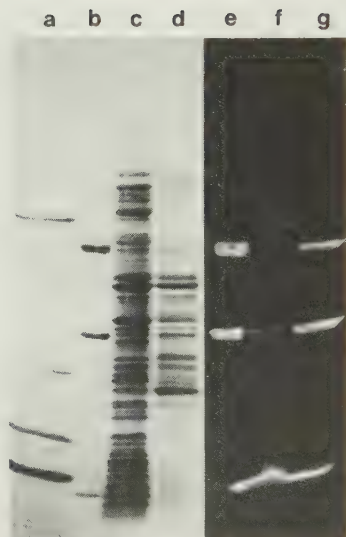


Abb.13: Immun-Fluoreszenzanfärbung mit Antiserum gegen die Citrat-Lyase. Eine Hälfte des Gels wurde mit Coomassie angefarbt (a-d), die Proteinbanden der anderen Hälfte des Gels (e-g) wurden wie im Methodenteil beschrieben auf Nitrocellulose übertragen und durch Immun-Fluoreszenzanfärbung untersucht. a) Marker-Proteingemisch, b) und e) gereinigte Citrat-Lyase, c) und f) Protein aus *E.coli* Zellen, die in M9 Medium mit Glucose und Citrat gezuchtet worden waren, d) und g) Protein aus Zellen des Klons DH1/Cit3, die in M9 Medium mit Citrat als Kohlenstoffquelle gezuchtet worden waren.

3. Genetische Untersuchung der Citrat-Fermentationsgene

3.1. Subklonierung des Gens für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase

Die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase sollten durch Subklonierung in die Expressionsvektoren pIN-III-A 1-3 isoliert werden. Das Expressionssystem umfaßt drei Vektoren, um Insert-DNA in jedem Leseraster zu exprimieren. Plasmid pES3 wurde mit Restriktionsendonuklease *Sau* 3A1 partiell abgebaut und die Fragmente in die mit *Bam* HI geöffneten und anschließend Phosphatase-behandelten Expressionsvektoren pIN-III-A 1-3 ligiert. Als Rezipientenstamm diente *E.coli* JA221. Jeweils 500 Ap^r Transformanten/Leseraster wurden immunologisch auf Expression der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase getestet. Vier Klone zeigten sich nach Anfärbung mit FITC-markierten Antikörpern positiv. Der am stärksten fluoreszierende Klon JA221/Sc1 (Abb.14) exprimierte die Untereinheit in pIN-III-A1, die beiden weniger stark fluoreszierenden "Kolonien" - JA221/Sc2 und 3 - in pIN-III-A3, eine weitere, allerdings nur sehr schwach mit dem Antiserum reagierende Transformante (JA221/Sc4) enthielt pIN-III-A2 mit Insert.

Bei keinem der Klone konnte die Expression durch Weglassen von IPTG im Anzuchtmedium wesentlich reduziert oder gar reprimiert werden. Diese Beobachtung wurde von H.Michel und G.Pühler, die ebenfalls das Vektorsystem angewendet hatten, bestätigt (Michel et al. 1985; Pühler, 1984).

Plasmid-DNA (pSC1) wurde aus Klon JA221/Sc1, der näher untersucht werden sollte, isoliert. Nach Spaltung mit Restriktionsendonuklease *Eco* RI wurden ein 12kb und ein 2.5kb Fragment erhalten. Da der Expressionsvektor nur eine *Eco* RI Erkennungsstelle in der Polylinker Region besitzt, muß das 2.5kb *Eco* RI Fragment stromabwärts vom Expressions-

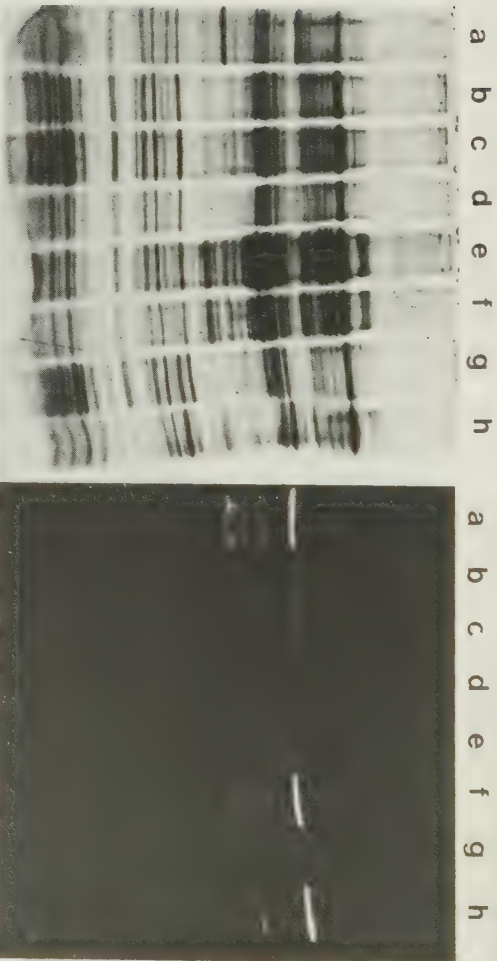


Abb. 14: Immun-Fluoreszenzanalyse mit Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase.

a-d) Vesikelprotein der Subklone JA221/Sc1 (a), JA221/Sc2 (b), JA221/Sc3 (c), JA221/Sc4 (d). Alle Transformanten des Rezipienten JA221

sowie Zellen des plasmidfreien Rezipienten JA221 waren in LB-IPG Medium gezüchtet worden. Die sehr schwache Reaktion des Proteins von Klon JA221/Sc4 mit dem Antiserum ist mit dieser Immun-Fluoreszenzanalyse nicht zu erkennen.

e) Vesikelprotein des plasmidfreien Rezipienten JA221

f) Vesikelprotein des Klons JA221/SC1E

g) Vesikelprotein des Klons JA221/ScT

h) Vesikelprotein des Klons DH1/Cit3 (in Citrat-Minimalmedium gezüchtet)

promotor liegen. Das 12kb Fragment wurde aus dem Gel durch Elektroelution extrahiert, mit sich selbst ligiert und wiederum in den ursprünglichen Rezipienten JA221 sowie *E.coli* Stamm DH1 transformiert. Auch Transformanten, die dieses Plasmid (pSC1E) erhalten hatten, exprimierten noch die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase (Abb.14). Dies bedeutet zum einen, daß die Entfernung des promotorproximalen *Eco* RI Fragmentes die Transkription der α Untereinheit des Enzyms nicht beeinträchtigt. Zum anderen sollte das *Eco* RI Fragment keinen Transkriptionsstop enthalten, da die Expression nahezu konstitutiv erfolgte und damit das Gen der α Untereinheit sehr wahrscheinlich der Kontrolle des Vektorpromotors bei Klon JA221/Sc1 wie JA221/Sc1E (DH1/Sc1E) unterliegt.

Vesikelpräparationen von JA221/Sc1 wiesen allerdings keine Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität auf. Daraus folgt, daß Plasmid pSC1 nicht alle Strukturgene des Enzyms kodiert.

Analoge Versuche, einen die Citrat-Lyase exprimierenden Subklon mit Hilfe des Antiserums gegen die Citrat-Lyase zu detektieren, blieben ohne Erfolg. Es ist möglich, daß die obgleich geringe Kreuzreaktion des Antiserums mit dem *E.coli* Enzym das "Hintergrund-Signal" zu stark erhöht, um eine eindeutige Unterscheidung zwischen exprimierenden und nicht exprimierenden Kolonien zu erlauben.

In einem weiteren Experiment wurden die Expressionsklone auf Citratverwertung getestet. Dabei wurde ein Klon (JA221/ScT) erhalten, der auf Citrat aerob wesentlich schneller wuchs, als Transformanten mit Plasmid pES3. Im Anaeroben zeigten Zellen von JA221/ScT ein eher langsames Wachstum auf Citrat als Transformante DH1/Cit3, auch nachdem das Plasmid (pSCT) in das isogene System von DH1 transformiert worden war. Das Wachstumsverhalten auf Citrat wurde allerdings nicht durch Kinetiken quantifiziert. Wahrscheinlich kodiert Plasmid pES3 neben der Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase auch ein Citrat-Transportsys-

tem, das in Klon ScT (pSCT) nun unter der Kontrolle des starken Expressionspromotors steht. Da pSCT-Transformanten sich sowohl als Ap^r wie Cm^r erwiesen, kann davon ausgegangen werden, daß sich neben dem Expressionsvektor auch noch Anteile des Cosmid-Vektors, zumindest dessen Cm-Resistenz-Determinanten, auf dem Plasmid befinden. Plasmid-DNA wurde aus Transformante DH1/ScT isoliert. Die auf Agarosegelen analysierte, ungeschnittene Plasmid-Präparation zeigte mehrere Plasmide. Durch Transformation und anschließende Selektion auf Ap-Resistenz und Wachstum auf Citrat konnte das den Cit⁺Phänotyp vermittelnde Plasmid nicht abgetrennt werden. Transformante DH1/ScT wurde genetisch nicht weiter untersucht. In Citrataufnahmeversuchen wies P.Dimroth jedoch einen Na⁺-abhängigen Citrat-Transport in diesen Zellen nach (Manuskript in Bearbeitung), der den *E.coli* Kontrollzellen ohne Plasmid fehlte. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis für die Existenz eines Citrat-Transportgens auf Plasmid pES3.

3.2. Grobkartierung des Plasmids pES3 und Vorschlag zur Anordnung der Gene für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase und die γ Untereinheit der Citrat-Lyase

Mit Hilfe von Hybridisierungsversuchen mit ^{32}P -markierten Oligonukleotiden sollten die Gene für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase und die γ Untereinheit der Citrat-Lyase auf dem Cosmid lokalisiert werden. Die aminoterminal Sequenz der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase war von K.Beyreuther und H.Reinke zur Verfügung gestellt worden (unveröffentl. Daten). Sie ist in Abb.15 gezeigt.

Abb.15: Aminosäure- und Basensequenz des Aminoterminus der Oxalacetat-Decarboxylase α Untereinheit

NH ₂ Thr Val Ala Ile Thr Asp Val Val									Aminosäuresequenz
	C	C	C	C	C		C	C	
	A	A	A	A	A	T	A	A	
5'	AC	GT	GC	AT	AC	GA	GT	GT	mögliche DNA Sequenzen
	G	G	G	G	G	C	G	G	
	T	T	T	T	T		T	T	
	C	G	G	T	C	T	G		
5'	AC	GT	GC	AT	AC	GA	GT	GT	synthetisiertes Oligo-
	G	C	C	C	G	C	C		nukleotid (NUC 60)

Wie daraus hervorgeht, weist die Sequenz an acht Stellen durch "wobble" der dritten Base Entartungen auf. Dies bedeutet, daß von 32768 theoretisch möglichen Basensequenzen die Natur nur eine verwirklicht hat. Es wurde daher ein Oligonukleotidgemisch (NUC 60) unter Berücksichtigung des "codon usage" von *K.pneumoniae* (MPI-Datensammlung) synthetisiert und somit die Anzahl der im Versuch eingesetzten DNA-Ketten auf 128 reduziert. Hybridisierungsversuche mit dem radioaktiv markiertem NUC60 Oligonukleotidgemisch ergaben mit auf Nitrocellulosefilter übertragenen DNA Fragmenten von pES3 und pSC1E im Bereich der theoretischen Hybridisierungs-Temperatur ($=72-76^{\circ}\text{C}$, s.Methoden) keine positiven Signale. Erst nachdem die Inkubationstemperatur auf $30-35^{\circ}\text{C}$ herabgestellt worden war, hybridisierten die Oligonukleotide spezifisch mit Restriktionsfragmenten der Plasmide pES3 und pSC1E.

In weiteren Experimenten sollte der DNA Abschnitt des Cosmids ermittelt werden, der die γ Untereinheit, nämlich das Acyl-Carrier Protein der Citrat-Lyase kodiert. Die gesamte Aminosäuresequenz dieser Proteinuntereinheit ist durch Arbeiten von K.Beyreuther et al. (1978) bekannt. Als geeignete Sequenz für die Synthese von Oligonukleotiden erwies sich das in Abb.16 gezeigte Peptid, nach welchem ein synthetisches 20mer (NUC CL1) mit 32 Entartungen entstand (Abb.16). Das Oligonukleotidgemisch hybridisierte spezifisch mit DNA Fragmenten von pES3 im berechneten Temperaturbereich ($52-60^{\circ}\text{C}$).

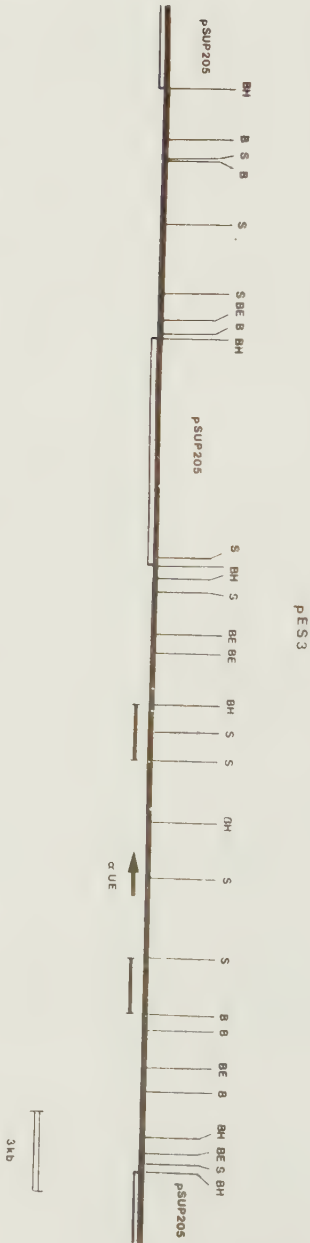


Abb.17: Ergebnis der Grobkartierung von Plasmid pES3. Die ermittelten Fragmentlängen können bis zu 10% von der tatsächlichen Größe abweichen. Es konnten nicht alle *SaI* I Fragmente zugeordnet werden.

Der die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase kodierende DNA Abschnitt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, der gleichzeitig die Transkriptionsrichtung angibt. Die mit dem Oligonukleotidgemisch NUC CL1 hybridisierenden Regionen sind durch Balken angegeben.

B = *Bgl* II, BE = *Bst* EII, BH = *Bam* HI, S = *SaI* I

3.3. DNA Sequenz des Aminoterminus der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase

Um eine gezielte Sequenzierung des Gens für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase zu ermöglichen, wurden Hybridisierungsexperimente mit Oligonukleotidgemisch NUC 60 und auf Nitrocellulose übertragenen DNA Fragmenten von Plasmid pSC1E durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche ist zusammen mit einer Restriktionskarte von pSC1E in Abb.18 festgehalten.



Abb.18: Restriktionskarte von pSC1E. Das mit dem Oligonukleotidgemisch NUC 60 hybridisierende DNA Fragment ist durch einen Balken gekennzeichnet. A = *Asp* 718, E = *Eco* RI, P = *Pst* I, S = *Sal* I, X = *Xba* I. Ein weiteres etwa 560 bp langes *Asp* 718 Fragment konnte nicht kartiert werden.

Das 32 P-markierte Oligonukleotidgemisch reagierte mit einem 265bp langem *Xba* I - *Pst* I Fragment, das unmittelbar stromabwärts vom Vektorpromotor liegt. Dieses Fragment wurde

in M13 Derivat mp18 und mp19 kloniert und beide Stränge sequenziert. Die DNA Sequenz und die daraus abgeleitete Übersetzung in Proteinsequenz ist in Abb.19 gezeigt. Wie daraus hervorgeht, beginnt die erste transkribierte Aminosäure nur eine Base nach der *Eco* RI Schnittstelle, die den Übergang zur Vektor-DNA darstellt. Der Bereich der Sequenz, zu dem das Oligonukleotid komplementär ist, wurde gekennzeichnet. Da die Hybridisierung des unter Berücksichtigung des "codon usage" synthetisierten Oligonukleotids durch eine an Base 6 des Oligonukleotids vorliegende "mismatch"-Stelle wesentlich erschwert war, hatte dies, wie in Kapitel 3.2. schon erwähnt, eine Reduktion der theoretisch berechneten Hybridisierungs-Temperatur von etwa 40°C zur Folge.

Vergleicht man die Restriktionskarte des Inserts von Plasmid pSC1E mit jener des gesamten Cosmids pES3, so fällt auf, daß die Anordnung der *Sal* I Fragmente nicht übereinstimmt. In Cosmid pES3 befindet sich stromabwärts des 3kb *Sal* I Fragmentes, das positiv mit dem Oligonukleotidge-misch NUC 60 reagierte, also in Transkriptionsrichtung des Gens für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase ein etwa 4.5kb großes *Sal* I Fragment. In pSC1E dagegen kodiert ein etwa 2.8kb langes *Sal* I Fragment den Carboxylterminus der großen Untereinheit. Dieses *Sal* I Fragment enthält auch keine *Bam* HI Schnittstelle wie das 4.5kb Restriktionsfragment in von pES3. Hierfür gibt es eine plausible Erklärung: Plasmid pSC1 bzw. pSC1E enthält DNA von Plasmid pES3, die mit *Sau* 3AI partiell abgebaut worden war. Offensichtlich wurden bei der Ligase-Behandlung zwei *Sau* 3AI Fragmente, die im Cosmid getrennt waren, zusammen in den Vektor ligiert. Da die Expression der α Untereinheit in Klon JA221/Sc1E durch Immun-Fluoreszenz-anfärbung bewiesen war, kann davon ausgegangen werden, daß das 2.8kb *Sal* I Fragment des Plasmids pSC1E den gesamten Carboxylterminus der Untereinheit kodiert. Die Verbindungsstelle zum zweiten, "anligierten" *Sau* 3AI Fragment muß also stromabwärts vom

Strukturen der α Untereinheit liegen.

Abb.19: DNA Sequenz des Aminoterminus der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase. Die fett gedruckten Basen stellen das hybridisierende Oligonukleotid dar. Die "mismatch" Stelle ist gekennzeichnet (*).

*

<i>Xba</i> I		<i>Eco</i> RI	ACC GTG GCC ATT ACC
TCTAGAGGGTATTAATA	ATG AAA GGG AAT TCA TGACC	GTT GCC ATT ACC	
Lipoprotein:	Met Lys Gly Asn Ser Stop		
Oxalacetat-Decarboxylase:	Met Thr Val Ala Ile Thr		

GAT GTC GT

GAT GTC GTC CTG CGC GAC GCC CAC CAG TCC CTG TTC GCC ACC CGT
Asp Val Val Leu Arg Asp Ala His Gln Ser Leu Phe Ala Thr Arg

CTG CGT CTC GAC GAT ATG CTG CCC GTT GCC GCT CAG CTG GAC GAC
Leu Arg Leu Asp Asp Met Leu Pro Val Ala Ala Gln Leu Asp Asp

GTC GGC TAC CGC TCG CTG GAG TGC TGG GGC GGC GCC ACC TTT GAC
Val Gly Tyr Arg Ser Leu Glu Cys Trp Gly Gly Ala Thr Phe Asp

GCC TGC ATC CGC TTC CTC GGC GAG GAC CCG TGG GGT CCG CCT GCG
Ala Cys Ile Arg Phe Leu Gly Glu Asp Pro Trp Gly Pro Pro Ala

CGA GCT GAA AAA GGC GAT GCC CAA GAC CCC GCT GCA
Arg Ala Glu Lys Gly Asp Ala Gln Asp Pro Ala Ala

Durch Spaltung mit Restriktionsendonuklease *Xba* I war zusammen mit dem Insert ein kleiner Teil des Expressionsvektors, nämlich die Polylinker-Region bis zur *Eco* RI Schnittstelle, ebenfalls sequenziert worden. Dieser Polylinker-Abschnitt kodiert die ersten fünf Aminosäuren des *E.coli* Lipoproteins. Somit werden in diesem Expressionssystem immer Fusionsproteine synthetisiert, die aminoterminal einige Reste des Lipoproteins tragen. Erstaunlicherweise liegt nun aber das exprimierte Gen nicht im Leseraster mit dem Lipoprotein, sondern ist um eine Base nach (+1) versetzt. Dieser Sachverhalt kann jedoch interpretiert werden: Die ersten drei Kodons des Lipoproteins und ebenso die beiden nachfolgenden Tripletts des Inserts werden vom Ribosom translatiert; dann allerdings erfolgt durch das "opal" Kodon *TGA* Kettenabbruch. Nun enthält aber die m-RNA -6 vom Startkodon des exprimierten Gens entfernt die Basensequenz *AAGG*, die der Shine-Dalgarno Konsensus-Sequenz entspricht. Wahrscheinlich wird diese zufällig im richtigen Abstand zum Startkodon liegende Ribosomenbindungsstelle genutzt und die Translation beginnt in diesem Fall am Startkodon des Gens für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase.

3.4. Versuch zum Nachweis einer polycistronischen m-RNA in Transformanten mit Plasmid pSC1

Das promotorproximale 2,5kb *Eco* RI Fragment aus Plasmid pSC1 konnte ohne Auswirkung auf die Expression der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase entfernt werden. Da die Synthese der Untereinheit konstitutiv erfolgte, lag die Vermutung nahe, daß die Transkription der Kontrolle des Vektorpromotors unterliegt. Demnach sollte die RNA Polymerase über das 2,5kb *Eco* RI Fragment hinweg bis zu einem Transkriptionsstop stromabwärts vom Carboxylterminus der α Untereinheit lesen. Wie auf Grund der DNA Sequenzdaten bekannt ist, beginnt der offene Leserahmen für das

Strukturgen der 65kD großen Untereinheit unmittelbar nach der *Eco* RI Schnittstelle. Infolgedessen mußte ein Transkript, das nach überschreiben des 2.5kb *Eco* RI Fragments und des etwa 2kb langen Strukturgens der großen Untereinheit entstanden ist, etwa 4500 Nukleotide betragen. Um eine derartige polycistronische m-RNA in Transformanten mit Plasmid pSC1 nachzuweisen, sollte das den Carboxylterminus der α Untereinheit kodierende 2.8kb *Sa*I I Fragment aus Plasmid pSC1E gegen Gesamt-RNA aus Klon DH1/Sc1 hybridisiert werden. Das *Sa*I I Fragment wurde durch Elektroelution aus einem Agarosegel isoliert und durch Nick-Translation radioaktiv markiert. Gesamt-RNA wurde aus Zellen von DH1/Sc1 präpariert, auf Formaldehydgelen aufgetrennt und durch Elektro-Transfer auf GeneScreen Membranen übertragen. Hybridisierungsexperimente mit dem radioaktiven *Sa*I I Fragment ergaben jedoch kein Signal eines etwa 4000 Nukleotide langen Transkripts, sondern eines sehr viel kleineren RNA Molekuls. Da die ribosomale RNA (16S r-RNA = 1541 Nukleotide, 23S r-RNA = 2904 Nukleotide; Brosius et al. 1978; Brosius et al. 1980) unspezifisch mit der Hybridisierungs-Probe reagierte, konnte anhand dieser internen Markernukleinsäuren die Größe des Transkripts mit ungefähr 800 Nukleotiden bestimmt werden. Wie aus diesem Ergebnis hervorgeht, muß stromabwärts vom Carboxylterminus der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase ein weiterer offener Leserahmen vorhanden sein, der ein etwa 800 Basen langes Transkript kodiert. Fraglich ist allerdings, ob der Leserahmen für dieses Transkript sich auch im Cosmid-Insert von pES3 direkt an das Strukturgen für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase anschließt, da zwei auf dem Cosmid getrennt liegende *Sau* 3AI Restriktionsfragmente zu dem Insert von pSC1E (pSC1) ligiert worden waren (3.3.).

Zwei Erklärungen können für die nicht erfolgte Hybridisierung mit einem Transkript von etwa 4000 Nukleotiden gegeben werden:

1) Der Transfer von derartig großen RNA Molekülen auf

GeneScreen Membranen geht nur sehr ineffizient vonstatten. Dies laßt sich aus der Beobachtung schließen, daß die nach Transfer angefarbten Gele keine 16S r-RNA Banden mehr aufwiesen, jedoch noch eine intensive Bande der 23S r-RNA, von der offensichtlich nur ein kleiner Teil auf die Membran übertragen worden war. Da die m-RNA nur ungefähr 5% der Gesamt-RNA ausmacht, bedeutet eine schlechte Übertragung großer Transkripte eine drastische Reduzierung der auf den Membranen für eine Hybridisierung zur Verfügung stehenden Moleküle.

2) Das 2,5kb lange *Eco* RI Fragment trägt einen Promotor für die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase. Von diesem Promotor erfolgt auch die Synthese der m-RNA. Diese sollte aber der Kontrolle des Vektorpromotors unterliegen, da das Protein ja konstitutiv exprimiert wird. Entsprache nun die Transkriptlänge der Größe der 23S r-RNA, so wurde eine spezifische Hybridisierung in dem "Hintergrund-Signal" der auf den Autoradiographien gut sichtbaren, unspezifischen Hybridisierung des Fragments mit der ribosomalen RNA verschwinden.

Welche der Erklärungen zutrifft, soll mit S1 "Mapping" Versuchen geklärt werden.

E. DISKUSSION

1. Transposon Tn5- und chemische Mutanten

Nach Transposon Tn5- und chemischer Mutagenese konnten Mutanten von *K.pneumoniae* ATCC 13882 erhalten werden, die nicht mehr in der Lage waren, Citrat als einzige Kohlenstoffquelle zu vergären (anaerober Cit⁺-Phänotyp). Mit einer Ausnahme zeigten alle Mutanten sowohl eine reduzierte Oxalacetat-Decarboxylase wie Citrat-Lyase Aktivität. Durch immunologische Versuche wurde bei fünf von elf Mutanten ein Ausfall der Proteinsynthese von Untereinheiten beider Enzyme nachgewiesen. Da die Reversionsraten der MNNG-Mutanten zum anaeroben Cit⁺-Phänotyp zwischen 10^{-5} - 10^{-6} lagen, kann das Vorliegen von Punktmutationen bei diesen Mutanten angenommen werden. Die Punktmutationen rufen bei fünf von sechs MNNG-Mutanten pleiotrope Veränderungen hervor. Daraus läßt sich schließen, daß bei *K.pneumoniae* ATCC 13882 die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase einer gemeinsamen Regulation unterliegen. Hierfür kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

1. Die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase liegen in einer Transkriptionseinheit und sind dadurch der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors mit möglicherweise vorgeschalteten Regulationselementen unterworfen.

2. Die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase besitzen jeweils eigene Promotoren, die allerdings von übergeordneten Kontrollelementen reprimiert oder aktiviert werden. Ein derartiges Regulonsystem liegt zum Beispiel in *E.coli* bei den Genen vor, die für den Abbau von Maltose verantwortlich sind (Bedouelle et al. 1982). Als Regulonsystem kann auch die anaerobe Regulation terminaler Oxido-Reduktasen wie NO₃-Reduktase, Fumaratreduktase und

weiterer Enzyme des anaeroben Stoffwechsels bei Enterobakterien durch das *fnr* (*nir*) Genprodukt verstanden werden (Lambden & Guest, 1976; Chippaux et al. 1978; Shaw et al. 1983; Pecher, 1984).

Diese beiden möglichen Arten der Regulation sollen im Folgenden mit Hinblick auf die vorliegenden Mutationen bei den anaeroben Cit-Klonen kurz diskutiert werden.

Zunächst wird der Fall einer gemeinsamen Transkriptionseinheit für Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase Gene angenommen. Bei MNNG-Mutanten, die keine Synthese der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase und der α wie β Untereinheit der Citrat-Lyase mehr aufwiesen, können entweder Mutationen im Promotorbereich zusammen mit vorgeschalteten Regulationssequenzen vorliegen oder aber Strukturgendefekte, wie z.B. Rasterverschiebungen, die den Ausfall mehrerer stromabwärts liegender Gene hervorrufen. Auch die Transposon Tn5-Mutanten zeigten durchwegs einen pleiotropen Phänotyp. Demnach sollten auch diese Klone die Transposon-Insertion, die sich zumeist polar auswirkt (Calos & Miller, 1980), in promotorproximalen DNA Abschnitten oder in der Promotor- und Kontrollregion selbst besitzen.

Setzt man ein Regulonsystem der Citrat-Fermentationsgene voraus, so sollten alle Mutationen, die die Funktion beider Enzyme beeinträchtigen oder deren Synthese verhindern, die zentrale Regulationseinheit betreffen. Es erhebt sich nun die Frage, ob diese zentrale Regulation über das *fnr* Genprodukt zustande kommt. Mutationen im *fnr* Gen können jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, da alle Mutanten zu einem anaeroben Stoffwechsel mit Glucose oder Pyruvat als Kohlenstoffquelle befähigt waren. Diese Tatsache erlaubt allerdings keine Aussage darüber, ob und inwieweit die Citrat-Fermentation bei *K.pneumoniae* Wildtyp-Zellen einer Kontrolle durch *fnr* unterliegt.

Mit einer Ausnahme zeigten alle Mutanten, bei denen eine reduzierte Citrat-Lyase Aktivität festgestellt worden war, auch eine verminderte Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität. Nur die MNNG-Mutante F enthält wahrscheinlich eine Strukturgenmutation der Citrat-Lyase, da Zellen dieses Klons allein eine reduzierte Citrat-Lyase Aktivität aufwiesen, dagegen eine dem Wildtyp entsprechende Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität. Obgleich eine Gesamtzahl von elf Mutanten zu gering ist, um eine Verteilung der Defekte zu untersuchen, fällt auf, daß zehn Mutanten pleiotrope Ausfälle besaßen. Allerdings war eine Beeinträchtigung der Citrat-Lyase Funktion in unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten. Während vier MNNG-Mutanten und zwei Tn5-Mutanten beide Enzymfunktionen stark reduziert besaßen, lag bei MNNG-Mutante T9-8 und drei Tn5-Mutanten nur eine teilweise verminderte Citrat-Lyase Aktivität vor. Da sich Defekte in der Oxalacetat-Decarboxylase offensichtlich immer mehr oder weniger polar auf die Citrat-Lyase Funktion auswirken, kann, setzt man eine Transkriptionseinheit für die Gene beider Enzyme voraus, auf die Anordnung der Gene im Operon geschlossen werden. So sollten die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase promotorproximal, die der Citrat-Lyase promotordistal vorliegen.

Erstaunlich ist dennoch die Tatsache, daß nur eine Mutante mit defekter Citrat-Lyase (Klon F) isoliert wurde. Möglicherweise existieren Bereiche in den Genen der Citrat-Fermentation, die sich leichter durch mutagene Agentien wie MNNG verändern lassen als andere Regionen. Weniger erstaunlich ist dieser Sachverhalt bei Transposon Tn5-Mutanten, da eine gewisse Bevorzugung von bestimmten DNA Bereichen bei Tn5 Insertionen bereits häufig beschrieben wurde (Kleckner et al. 1977; Shaw & Berg, 1979; McKinnon et al. 1985; Sasatsu et al. 1985).

Die Isolierung mehrerer Mutanten, die, wie in der Arbeit durch Immun-Fluoreszenz-anfärbung bewiesen, keine

Citrat-Lyase synthetisieren, widerlegt die Hypothese Kullas (1983), die Citrat-Lyase lasse sich nicht mutativ von Enterobakterien entfernen. Im Gegensatz zu den von Kulla (1983) veröffentlichten Ergebnissen konnten von *K. pneumoniae* ATCC 13882 Citrat-Lyase negative Mutanten erhalten werden. Möglicherweise bestehen jedoch stammspezifische Unterschiede sogar innerhalb der Spezies *K. pneumoniae*. Auf keinen Fall allerdings kann an Kullas Hypothese festgehalten werden, die Citrat-Lyase übe generell eine essentielle Schutzfunktion bei Citrat fermentierenden Enterobakterien aus.

Die Mutanten werden für die Aufklärung des anaeroben Citrat-Metabolismus und seiner Regulation von Interesse sein. Aufschluß über die Art der vorliegenden Mutationen - also Strukturgen- oder Regulationsgenveränderung - kann durch Komplementationsversuche der MNNG-Mutanten mit den in Vektor pSUP205 klonierten Citrat-Fermentationsgenen (pES3) bzw. daraus subklonierten Fragmenten erhalten werden. Weiterhin müssen die das Transposon flankierenden DNA Abschnitte der Transposon Tn5-Mutanten auf eine Homologie zur pES3 Insert-DNA untersucht werden.

2. Isolierung von drei Citrat verwertenden *E. coli* Klonen aus einer Cosmid-Genbank

Aus einer Cosmid-Genbank mit *K. pneumoniae* Wildtyp-DNA wurden drei Citrat verwertende *E. coli* Klone isoliert. Zwei Klone (DH1/Cit1, DH1/Cit2) wuchsen nur aerob in Citrat-Minimalmedium, Klon DH1/Cit3 dagegen zeigte sowohl aerobe als auch anaerobe Citratverwertung. Wie sich durch Restriktionsanalysen ergeben hatte, enthielten die aus den drei Cit⁺-Klonen isolierten Cosmide keine gemeinsamen Fragmente. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die Grundlage für den Cit⁺ Phanotyp in jedem der Klone eine andere ist. Dies bedeutet auch die Existenz mehrerer Citrat- oder

Tricarboxylat-Transportsysteme in *K.pneumoniae* ATCC 13882. Nur ein Beispiel in der Literatur dokumentiert bislang die gezielte Klonierung enterobakterieller Tricarboxylat-Transportsysteme in *E.coli* (Somers & Kay, 1983). Die drei Cit⁺ *E.coli* Isolate und deren Plasmide sollen im folgenden Abschnitt getrennt besprochen werden.

1. Klon DH1/Cit1 besitzt durch Plasmid pES1 vermutlich ein aerobes Citrat-Transportsystem. Alle Transformanten, die Plasmid pES1 erhalten hatten, zeigten einen aeroben Cit⁺Phänotyp. Damit ist bewiesen, daß die Eigenschaft der Citratverwertung vom Plasmid vermittelt wird. Da auf Glycerin vorgezogene Zellen ebenso schnell wie auf Citrat vorkultivierte Zellen nach Überführung in Citratmedium zu exponentiellem Wachstum übergingen, kann auf ein konstitutives Transportsystem geschlossen werden.

2. Plasmid pES2 aus Klon DH1/Cit2 kodiert wahrscheinlich ebenfalls ein aerobes Citrat-Transportsystem. Auffallend ist jedoch, daß weniger als 1% der mit Plasmid pES2 transformierten Zellen einen Cit⁺Phänotyp aufwiesen. Dieser Sachverhalt kann nicht mit einer Induzierbarkeit des Transportgens durch Citrat erklärt werden, da DH1/Cit2 Zellen unabhängig von der Art der Vorkultivierung nach einer kurzen "lag" Phase in die exponentielle Wachstumsphase eintraten. Es ist möglich, daß in *E.coli* zuerst Veränderungen auf DNA Ebene erfolgen müssen, damit durch pES2 ein Cit⁺Phänotyp etabliert werden kann. Eingehendere Untersuchungen sind nötig um dies zu überprüfen.

3. Isolat DH1/Cit3 zeigte aerobe und anaerobe Citratverwertung. Wie weiter unten noch detailliert ausgeführt wird, besitzt dieser Klon durch Plasmid pES3 neben den Genen der Oxalacetat-Decarboxylase und eines Citrat-Transportsystems wahrscheinlich auch die der Citrat-Lyase. Vorerst soll nur auf die Wachstumseigenschaften eingegangen werden. DH1/Cit3 Zellen mit Plasmid pES3

wuchsen unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit einer Generationszeit von 5.5-6 h in Citrat-Minimalmedium. Offensichtlich bestimmt die Citrataufnahme die Geschwindigkeit des Bakterienwachstums, da Citrat im Aeroben durch den Citrat-Zyklus viel effizienter veratmet werden kann. Nach Vorkultivierung unter nicht induzierenden Bedingungen - also in M9 Minimalmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle - war eine "lag" Phase von etwa 40 h für die aerobe Citratverwertung und fast drei Tagen für die anaerobe Citratverwertung zu beobachten. Dagegen gingen auf Citrat vorgezogene Zellen von DH1/Cit3 sofort zu exponentiellem Wachstum über. Hierfür gibt es zwei Interpretationen:

- a) Die Citratverwertung in DH1/Cit3 ist durch Citrat induzierbar.
- b) Das Plasmid pES3 segregiert, sobald kein Selektionsdruck besteht, also andere Kohlenstoffquellen angeboten werden.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, zerfällt Plasmid pES3 sofort zu dem Plasmid pES31, wenn die Zellen nicht ständig zur Citratverwertung "gezwungen" werden. Dennoch trifft vermutlich auch Erklärung a) zu. Wenn nämlich nur die Plasmidinstabilität, hervorgerufen durch Kultivierung auf Glycerin, eine "lag" Phase in Citratmedium nach sich ziehen wurde, da viel weniger Zellen die zum Citratabbau benötigten Gene noch besitzen, sollte kein derart großer Unterschied zwischen der "lag" Phase der aeroben und der anaeroben Kultur bestehen. Zwei weitere Beobachtungen deuten auf das Vorhandensein einer induzierbaren Citrat-Fermentation kodiert durch Plasmid pES3 hin. Wie bei Plasmid pES2 zeigte auch nur ein Bruchteil der Transformanten mit Plasmid pES3 einen Cit⁺Phänotyp. Selektion auf anaeroben Citratabbau dagegen erhöhte den Anteil der Cit⁺Transformanten von 1-5% auf bis zu 20% der Gesamttransformantenzahl. Dies kann auf eine Citratinduktion durch eine erhöhte interne Citrat-Konzentration im Anaeroben zurückzuführen sein. Im Aeroben wird internes Citrat ständig über den Tricarbonsäurezyklus abgebaut, und da *E.coli* ja kein Aufnahmesystem für das

Substrat besitzt, wird die Konzentration wahrscheinlich nie so hoch sein um eine Induktion der Citrat-Transport- und Abbau-Gene zu ermöglichen.

Die Isolierung des Subklons JA221/ScT spricht ebenfalls für ein mit pES3 kloniertes induzierbares Citrat-Transportsystem. JA221/ScT Zellen besitzen ein Fragment der in pES3 klonierten Insert-DNA im Expressionsvektor pIN-III-A3 (pSCT). Auf Citrat wuchsen diese Transformanten im Aeroben wesentlich schneller als Transformanten mit pES3. Es ist deshalb anzunehmen, daß in Plasmid pSCT das Citrat-Transportsystem unter der Kontrolle des starken Promotors des Vektors steht und konstitutiv exprimiert wird. Ausgeschlossen werden kann allerdings nicht ein auf Grund einer höheren Kopienzahl des Plasmids pSCT vorliegender Gendosis-Effekt, der eine effizientere Citrataufnahme bewirkt.

Interessant ist der Aspekt des Gendosis Effekts auch für die Diskussion der Generationszeiten der drei Cit⁺Cosmid-Isolate. Berücksichtigt man eine Generationszeit von etwa 30-60 min bei *E.coli* in Glucose-Minimalmedium, so stellen Verdopplungszeiten von 7 h bei DH1/Cit1, 5 h bei DH1/Cit2 und ca.6 h bei DH1/Cit3 eine drastische Reduktion der Wachstumsrate dar. *K.pneumoniae* Zellen verdoppelten sich in 60 min im Aeroben bzw. in 90 min im Anaeroben in Citratmedium. Eine derartig kurze Generationszeit auf Citrat ist vielleicht teilweise auf das schon oben diskutierte Vorhandensein mehrerer Citrat-Transportsysteme bei *K.pneumoniae* zurückzuführen. Allerdings sollten die *E.coli* Cit⁺Transformanten dadurch, daß mehrere Kopien der Plasmide und damit der Transport-Gene in den Zellen vorliegen, Citrat hoch effizient transportieren können. Natürlich muß eine gewisse Verlangsamung des Wachstums durch die energieverbrauchende "Belastung" der Zellen durch große Cosmide angenommen werden. Offensichtlich bewirkt dies allein aber nicht die extreme Verminderung der Wachstumsraten, da die Cosmid-Klone in Glycerinmedium keine signifikante Abweichung

der Generationszeiten von der des plasmidfreien Rezipienten aufwiesen. Möglicherweise reguliert *E.coli* die Expression einer hohen Kopienzahl fremder Membranproteine auf eine bislang unverstandene Weise. Die langen Generationszeiten der Cit⁺ *E.coli* Isolate auf Citrat können aber auch mit einer unvollständigen Membranintegration der artfremden Citrat-Transportproteine erklärt werden.

3. Isolierung der Citrat-Fermentationsgene durch Plasmid pES3

In Vesikeln des Klons DH1/Cit3 wurde das Vorliegen der Oxalacetat-Decarboxylase immunologisch und durch Enzymtests nachgewiesen. Die ermittelte Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität betrug nur etwa 30% der mit *K.pneumoniae* Vesikeln gemessenen Aktivität. Auch dies spricht - wie schon oben erwähnt - entweder für eine ineffiziente Membranintegration der fremden Proteine oder es beruht auf einer weitgehenden Reprimierung der Oxalacetat-Decarboxylase Gene, die ja in vielen Kopien in der Zelle vorliegen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer Regulation auf Translationsebene.

Immunologisch nachweisbar war die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase nur in Vesikelpräparationen, die von in Citratmedium gezogenen Kulturen erhalten worden waren. Keine Antigen-Antikörper-Reaktion war bei Vesikelpräparationen von in M9 Glucose-Minimalmedium oder in LB Vollmedium kultivierten Zellen zu beobachten. Ein entsprechendes Resultat ergab sich mit *K.pneumoniae* Vesikeln. Nur Vesikel von in Citratmedium gezuchteten Bakterien reagierten mit dem Antiserum gegen die Oxalacetat-Decarboxylase, nicht aber jene aus Glucose-Minimalmedium. Wahrscheinlich wurde mit Plasmid pES3 die gesamte Einheit der Citrat-Fermentationsgene zusammen mit Regulationselementen erhalten, da schon die Ergebnisse der

Induktionsversuche auf eine durch das Insert vermittelte Kontrolle hindeuten.

Es gibt darüberhinaus Hinweise, daß auch die Gene der Citrat-Lyase auf Plasmid pES3 liegen. Antiserum gegen die α und β Untereinheit der Citrat-Lyase reagierte mit dem Rohextrakt des Klon DH1/Cit3. Eine Kreuzreaktion des Antiserums mit der *E.coli* Citrat-Lyase erwies sich durch ein Kontrollexperiment als insignifikant. Ein Oligonukleotidgemisch, das nach einem Peptid der bekannten Aminosäuresequenz des Acyl-Carrier Proteins der Citrat-Lyase synthetisiert worden war, hybridisierte spezifisch mit Restriktionsfragmenten des Plasmids. Nach Erstellen einer Restriktionskarte des Plasmids pES3 zeigte sich, daß das Oligonukleotidgemisch mit zwei DNA Abschnitten hybridisierte. Diese flankieren die die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase kodierende Region. Weitere Experimente sind nötig, um festzustellen, ob das Gen für das Acyl-Carrier Protein der Citrat-Lyase auf dem Insert amplifiziert vorliegt.

Durch Subklonierung in das Expressionsvektorsystem pIN-III-A konnte die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase konstitutiv exprimiert werden. Klon JA221/Sc1 wurde näher untersucht, da er - wie sich nach Immun-Fluoreszenzanfärbung gezeigt hatte - die größte Menge der α Untereinheit synthetisierte. Das aus Transformante JA221/Sc1 isolierte Plasmid pSC1 konnte durch Entfernen des dem Vektorpromotor benachbarten 2.5kb langen *Eco* RI Fragments zu Plasmid pSC1E ligiert werden. Auch dieses Plasmid exprimierte noch die α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß in Klon JA221/Sc1 eine polycistronische m-RNA vom Expressionspromotor synthetisiert wird. Das Transkript sollte sowohl das promotorproximale *Eco* RI Fragment enthalten wie auch das Strukturgen der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase. Wie sich aus Hybridisierungsversuchen und DNA Sequenzierung ergeben hatte, beginnt der Leserahmen für die α Untereinheit der

Oxalacetat-Decarboxylase mit dem Startkodon *ATG* eine Base nach der *Eco* RI Erkennungsstelle, also unmittelbar angrenzend an das 2.5kb *Eco* RI Fragment, das ohne die Expression zu beeinträchtigen entfernt werden kann. Demnach sollte die m-RNA, setzt man ein Durchlesen der RNA-Polymerase vom Expressionspromotor über das *Eco* RI Fragment hinaus bis zum Transkriptionsstop des Gens der großen Untereinheit voraus, etwa eine Länge von 4500 Nukleotiden besitzen. Um die Größe der m-RNA für die Oxalacetat-Decarboxylase α Untereinheit in Plasmid pSC1 zu bestimmen, wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und auf GeneScreen Membranen übertragen. Allerdings hybridisierte nur ein etwa 800 Basen langes Transkript mit dem Fragment, das den Carboxylterminus der α Untereinheit kodiert. Dieses Ergebnis spricht aber nicht gegen die Existenz eines polycistronischen "messengers", da derart große RNA Moleküle möglicherweise nur sehr unvollständig auf Membranen übertragen werden können oder vielleicht schon in den Zellen einer hohen Abbaurate unterliegen. Die Hybridisierung eines 800 Basen langen Transkripts deutet auf die Existenz eines weiteren offenen Leserahmens hin, der in Plasmid pSC1 bzw. pSC1E stromabwärts vom Carboxylterminus der α Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase liegt. Es muß allerdings noch geklärt werden, ob die mit diesem Versuch ermittelte Anordnung der offenen Leserahmen auch jener im Cosmid-Insert entspricht, da im Insert von Plasmid pSC1 (pSC1E) zwei auf dem Cosmid getrennt liegende Fragmente vorliegen.

Schwieriger als die Gene der Oxalacetat-Decarboxylase und Citrat-Lyase werden die der Citrat-Aufnahme auf dem Insert von pES3 zu lokalisieren sein, da hierfür keine Proteinsequenzen vorhanden sind. Daß ein Citrat-Transport durch Plasmid pES3 vermittelt wird, geht aus den Ergebnissen mit Transformanten des Plasmids pSCT hervor. Diese Zellen konnten Citrat aerob wesentlich effizienter abbauen als jene mit Plasmid pES3. Das Citrat-Transportsystem unterliegt in Plasmid pSCT vermutlich der Kontrolle des Expressionspromo-

tors. P.Dimroth konnte in Zellen des Klons JA221/ScT einen Na^+ -abhängigen Citrat-Transport nachweisen (Manuskript in Bearbeitung). Ein Na^+ -Citrat-Symport sollte Citrat fermentierenden Zellen erlauben, den durch die Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität aufgebauten Na^+ -Gradienten sogleich wieder für die Substrataufnahme zu nutzen. Durch eine Subklonierung des anaeroben Citrat-Transportsystems in *E.coli* Zellen kann der von Lütgens und Gottschalk (1980) postulierte Citratabbau ohne Oxalacetat-Decarboxylase jedoch in Gegenwart eines Cosubstrates nachgewiesen werden. Dies ist mit Plasmid pSCT nicht möglich, da nach Ergebnissen von P.Dimroth Transformanten des Plasmids eine schwache Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität aufwiesen. Durch DNA Sequenzierung in Verbindung mit S1 "Mapping" und Hybridisierungsexperimenten mit synthetischen Oligonukleotiden soll die Anordnung der Gene für die Citrat-Fermentation in dem *K.pneumoniae* Stamm ATCC 13882 untersucht werden. Wahrscheinlich ergeben sich daraus auch Hinweise für die Regulation des anaeroben Citrat-Metabolismus. Die Primärstruktur der Oxalacetat-Decarboxylase soll durch DNA Sequenzierung unter Zuhilfenahme von Peptidsequenzen, die derzeit von H.Reinke und K.Beyreuther in Köln erstellt werden, aufgeklärt werden.

F. LITERATUR

- Amarasingham, C.R. & Davis, B.D. (1965) Regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 240: 3664-3668
- Amersham-Protokoll: M13 cloning and sequencing handbook: Amersham International plc, U.K.
- Bachmann, B.J. (1983) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 7. Microbiol. Reviews 47: 180-230
- Bedouelle, H., Schmeissner, U., Hofnung, M. & Rosenberg, M. (1982) Promoters of the *malEFG* and *malK-lamB* operons in *Escherichia coli* K12. J. Mol. Biol. 161: 519-531
- Bergmeyer, H.U. (1974) Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie Weinheim
- Beringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198
- Beyreuther, K., Bohmer, H. & Dimroth, P. (1978) Amino-acid sequence of citrate-lyase acyl-carrier protein from *Klebsiella aerogenes*. Eur. J. Biochem. 87: 101-110
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523
- Bittner, M., Kupferer, P. & Morris, C.F. (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. 102: 459-471

Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. & Smithies, O. (1977) Charon phages: Safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science* 196: 161-169

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. & Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. a multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. & Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4801-4805

Brosius, J., Dull, T.J. & Noller, H.F. (1980) Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 201-204

Buckel, W. & Semmler, R. (1982) A biotin-dependent sodium pump: glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. *FEBS Lett.* 148: 35-38

Buckel, W. & Semmler, R. (1983) Purification, characterisation and reconstitution of glutaconyl-CoA decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 136: 427-434

Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203

Calos, M.P. & Miller, J.H. (1980) Transposable elements. *Cell* 20: 579-595

Cerda-Olmedo, E. Hanawalt, P.C. & Guerola, N. (1968) Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: Map and pattern of replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Mol. Biol.* 33: 705-719

Chippaux, M., Giudici, D., Abou-Jaoude, A., Casse, F. & Pascal, M.C. (1978) A mutation leading to the total lack of nitrite reductase activity in *Escherichia coli* K12. *Molec. Gen. Genet.* 160: 225-229

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18: 5294-5299

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114

Dagley, S. (1954) Dissimilation of citric acid by *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 11: 218-227

Dimroth, P., Buckel, W., Loyal, R. & Eggerer, H. (1977) Isolation and function of the subunits of citramalate lyase and formation of hybrids with the subunits of citrate lyase. *Eur. J. Biochem.* 80: 469-477

Dimroth, P. (1980) A new sodium-transport system energized by the decarboxylation of oxaloacetate. *FEBS Lett.* 122: 234-236

Dimroth,P. (1981) Reconstitution of sodium transport from purified oxaloacetate decarboxylase and phospholipid vesicles. J. Biol. Chem. 256: 11974-11976

Dimroth,P. (1981) Characterization of a membrane-bound biotin-containing enzyme: oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*. Eur. J. Biochem. 115: 353-358

Dimroth,P. (1982) The role of biotin and sodium in the decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella pneumoniae*. Eur. J. Biochem. 121: 435-441

Dimroth,P. (1982) The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na⁺-activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*. Eur. J. Biochem. 121: 443-449

Dimroth,P. & Thomer,A. (1983) Subunit composition of oxaloacetate decarboxylase and characterization of the α chain as carboxyltransferase. Eur. J. Biochem. 137: 107-112

Galivan,J.H. & Allen,S.H.G. (1968) Methylmalonyl Coenzyme A decarboxylase. J. Biol. Chem. 243: 1253-1261

Hall,B.G. (1982) Chromosomal mutation for citrate utilization by *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 151: 269-273

Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *E.coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580

Hertzberg, E.L. & Hinkle, P.C. (1974) Oxidative phosphorylation and proton translocation in membrane vesicles prepared from *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58: 178-184

Hilpert, W. & Dimroth, P. (1982) Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a Na⁺ gradient. Nature 296: 584-585

Hilpert, W., Schink, B. & Dimroth, P. (1984) Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion. EMBO J. 3: 1665-1670

Hirato, T., Shinagawa, M., Ishiguro, N. & Sato, G. (1984) Polypeptide involved in the *Escherichia coli* plasmid-mediated citrate transport system. J. Bacteriol. 160: 421-426

Hohn, B. (1979) *In vitro* packaging of λ and cosmid DNA. Methods Enzymol. 68: 299-309

Inouye, M. (1983) Experimental manipulation of gene expression. Hrsg: M. Inouye, Academic Press

Ishiguro, N. & Sato, G. (1979) The distribution of plasmids determining citrate utilization in citrate positive variants of *Escherichia coli* from humans, domestic animals, feral birds and environments. J. Hyg. 83: 331-344

Ishiguro, N., Sato, G., Sasakawa, C., Danbara, H. & Yoshikawa, M. (1982) Identification of citrate utilization transposon Tn3411 from a naturally occurring citrate utilization plasmid. J. Bacteriol. 149: 961-968

Ishiguro, N. & Sato, G. (1984) Spontaneous deletion of citrate utilizing ability promoted by insertion sequences. J. Bacteriol. 160: 642-650

- Ishiguro, N. & Sato, G. (1985) Nucleotide sequence of the gene determining plasmid-mediated citrate utilization. *J. Bacteriol.* 164: 977-982
- Jorgensen, R.A., Rothstein, S.J. & Reznikoff, W.S. (1979) A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance. *Molec. Gen. Genet.* 177: 65-72
- Kado, C.I. & Liu, S.-T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373
- Katz, L., Kingsbury, D.T. & Helinski, D.R. (1973) Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolite repression of the plasmid deoxyribonucleic acid - protein relaxation complex. *J. Bacteriol.* 114: 577-591
- Kleckner, N., Roth, J. & Botstein, D. (1977) Genetic engineering *in vivo* using translocatable drug-resistance elements. *J. Mol. Biol.* 116: 125-159
- Kulla, H.G. (1983) Regulatory citrate lyase mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 153: 546-549
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lambden, P.R. & Guest, J.R. (1976) Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J. Gen. Microbiol.* 97: 145-160
- Lara, F.J.S. & Stokes, J.L. (1952) Oxidation of citrate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 63: 415-420

Lehrach,H., Diamond,D., Wozney,J.M. & Boedtker,H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem. J.* 16: 4743-4751

Loening,U.E. (1969) The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 113: 131-138

Lutgens,M. & Gottschalk,G. (1980) Why a co-substrate is required for anaerobic growth of *Escherichia coli* on citrate. *J. Gen. Microbiol.* 119: 63-70

Mandel,M. & Higa,A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162

Maniatis,T., Fritsch,E.F. & Sambrook,J. (1982) "Molecular Cloning". A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

McKinnon,R.D., Wayne,J.S., Bautista,D.S. & Graham,F.L. (1985) Nonrandom insertion of Tn5 into cloned human adenovirus DNA. *Gene* 40: 31-38

Michel,H., Weyer,K.A., Gruenberg,H. & Lottspeich,F. (1985) The "heavy" subunit of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis* : isolation of the gene, nucleotide and amino acid sequence. *EMBO J.* 4: 1667-1672

Miller,J.H. (1972) "Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Murray,N.E., Brammar,W.J. & Murray,K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Molec. Gen. Genet.* 150: 53-61

Oeschger, M.P. & Berlyn, M.K.B. (1974) A simple procedure for localized mutagenesis using nitrosoguanidine. *Molec. Gen. Genet.* 134: 77-83

Pastan, I. & Adhya, S. (1976) Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Reviews* 40: 527-551

Pecher, A. (1984) Untersuchungen zur Physiologie und Regulation des Garungsstoffwechsels von *Escherichia coli*. Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Perlman, R.L. & Pastan, I. (1969) Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenyl cyclase deficient mutant of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 151-157

Pühler, G. (1984) Isolierung und Charakterisierung eines RNA-Polymerase-Gens von *Sulfolobus acidocaldarius*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Reynolds, C.H. & Silver, S. (1983) Citrate utilization by *Escherichia coli*: Plasmid- and chromosome-encoded systems. *J. Bacteriol.* 156: 1019-1024

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA Polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467

Sasatsu,M., Misra,T.K., Chu,L., Laddaga,R. & Silver,S. (1985) Cloning and DNA sequence of a plasmid-determined citrate utilization system in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 164: 983-993

Shaw,D.J., Rice,D.W. & Guest,J.R. (1983) Homology between CAP and fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 166: 241-247

Shaw,K.J. & Berg,C.M. (1979) *Escherichia coli* K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5. Genetics 92: 741-747

Shinagawa,M., Makino,S., Hirato,T., Ishiguro,N. & Sato,G. (1982) Comparison of DNA sequences required for the function of citrate utilization among different citrate utilization plasmids. J. Bacteriol. 151: 1046-1050

Simon,R., Priefer,U. & Pühler,A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechn. 1: 784-791

Somers,J.M. & Kay,W.W. (1983) Genetic fine structure of the tricarboxylate transport (*tct*) locus of *Salmonella typhimurium*. Molec. Gen. Genet. 190: 20-26

Southern,E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517

Steiner,M. (1980) Bakteriorhodopsin und zwei retinalbindende Komponenten in der Purpurmbran von *Halobakterium halobium*. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

- Stern, J.R. (1967) Oxalacetate decarboxylase of *Aerobacter aerogenes*. I. Inhibition by avidin and requirement for sodium ion. *Biochem. J.* 6: 3545-3551
- Tomas, J.M. & Kay, W.W. (1984) Tricarboxylate transport in a Cit⁺ *Escherichia coli*: evidence for the role of an outer membrane protein. *Can. J. Microbiol.* 30: 916-921
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Vogelsang, H., Oertel, W. & Oesterhelt, D. (1983) Isolation of the bacterioopsin gene by colony hybridization. *Methods Enzymol.* 97: 226-241
- Warburg, O. & Christian, W. (1942) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Zeitschr.* 310: 384-421
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119

G. ABKÜRZUNGEN

A ₄₂₀	Absorption bei 420nm
A _{x y}	Absorption bei xy nm
Ap	Ampicillin
Ap ^r	Ampicillin resistent
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Albumin aus Rinderserum
Cm	Chloramphenicol
Cm ^r	Chloramphenicol resistent
cpm	"counts per minute"
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
kD	kilo Dalton
Km	Kanamycin
Km ^r	Kanamycin resistent
Km ^s	Kanamycin sensitiv
min	Minute
MNNG	1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin
³² P	radioaktives Phosphorisotop
Nx ^r	Nalidixinsäure resistent
pfu	"plaque forming unit"
PNK	Polynukleotidkinase
psi	"pounds per square inch"
Rf ^r	Rifampicin resistent

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
m-RNA	"messenger" Ribonukleinsäure
t-RNA	"transfer" Ribonukleinsäure
RP-HPLC	"reversed phase" Flusssichhochdruck- chromatographie
^{35}S	radioaktives Schwefelisotop
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
Sm	Streptomycin
Sm ^r	Streptomycin resistent
Tc	Tetracyclin
Tc ^r	Tetracyclin resistent
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
Tn	Transposon
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
U	Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- β -D-galacto- pyranosid

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof.Dr. D.Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Oesterhelt für anregende und engagierte Gespräche und die wissenschaftliche Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. P.Dimroth danke ich für die gereinigten Enzyme und die Kooperation.

Weiterhin danke ich Herrn H.Reinke und Prof. K.Beyreuther für die Übermittlung von Peptidsequenzen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Studenten Manuela Bachmann, Thomas Dierks und Evi Laussermair für ihre Hilfe bei der Durchführung langweiliger Kontrollexperimente.

Frau Dr. H.Vogelsang und Herrn Dr. F.Pfeiffer danke ich für kritisches Korrekturlesen der Arbeit und nicht zuletzt gilt mein Dank allen, nicht namentlich aufgeführten Mitgliedern der Abteilung für ihre spontane Hilfsbereitschaft und Kameradschaftlichkeit.

Lebenslauf

Geburtsdatum	9.6.1957
Geburtsort	Ingolstadt
Eltern	Leo Schwarz Monika Schwarz, geb. Schmid

Schulbildung

1964-1968	Grundschule in Fürstenfeldbruck
1968-1977	Graf-Rasso-Gymnasium in Fürstenfeldbruck, neusprachlicher Zweig
1977	Abitur

Studium

1977-1981	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
1981-1982	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians- Universität, München Thema: Genetische und physiologische Unter- suchungen an klinischen Isolaten mit unspezifischer Aminoglykosid-Resistenz
Seit Oktober 1982	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Prof. D.Oesterhelt

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht:
Schwarz, E. und Oesterhelt, D. (1985) Cloning and expression
of *Klebsiella pneumoniae* genes coding for citrate transport
and fermentation.

The EMBO J. 4: 1599-1603

